



Ana Filipa Rodrigues Robalo

Licenciatura em Biologia Molecular e Genética

**Desenvolvimento de microgéis híbridos
para a sua aplicação em tratamentos de
hipertermia magnética**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Professor Doutor João Paulo Miranda Ribeiro
Borges, DCM-FCT/UNL

Coorientadora: Doutoranda Paula Isabel Pereira Soares DCM-
FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista

Arguente: Professora Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar de Oliveira Ricardo

Vogal: Professor Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2014

Desenvolvimento de microgéis híbridos para a sua aplicação em tratamentos de hipertermia magnética

Copyright © - Todos os direitos reservados. Ana Filipa Rodrigues Robalo;
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

**“Um dia de chuva é tão belo como um dia de sol.
Ambos existem; cada um como é ”**

Alberto Caeiro in Poemas Inconjuntos

Agradecimentos

Penso que o nosso (meu) crescimento e aprendizagem pessoal, não seriam possíveis sem a transferência de conhecimento entre nós e as pessoas, com as quais nos vamos cruzando. Durante esta etapa da minha vida não foi diferente, muitas pessoas tiveram um papel importante e por isso, não poderia deixar de agradecer e dizer “Muito Obrigada!”...

Ao meu coordenador o Professor João Paulo, pela disponibilidade com que me aceitou como aluna a orientar, pelo tempo despendido, pelas sugestões, apoio e conhecimentos transmitidos.

À Paula e à Coro pela disponibilidade e paciência, pelo conhecimento que me transmitiram, pelas críticas construtivas que me levavam sempre a querer fazer melhor e por me ajudarem a relativizar as coisas, quando foi preciso.

À Susete Fernandes, à Ana Baptista, à Ana Catarina e ao João Canejo pelo conhecimento e ajuda que me prestaram.

Ao CENIMAT pela cedência de equipamentos e pelo apoio dos seus funcionários, nomeadamente na obtenção das imagens por SEM.

À Tânia, ao Francisco, à Alicja, à Augusta e a todas as pessoas do laboratório por tornarem o ambiente de trabalho agradável.

À Vanessa, ao Pedro e à Xavi por poder contar com eles e por me ouvirem nos dias menos bons.

À minha família, sempre um pilar.

À minha afilhada Catarina pela alegria que trás à minha vida e por me ensinar a olhar para tudo de um modo tão simples.

Aos meus pais, por tudo e mais alguma coisa. Pelos valores que sempre me passaram, pela confiança, pelo carinho e por me apoiarem nas minhas “aventuras”.

Resumo

A adição de nanopartículas magnéticas a polímeros termossensíveis permite desenvolver sistemas híbridos com possíveis aplicações biomédicas no âmbito do diagnóstico e/ou da terapia. A variedade de aplicações ao nível biomédico advém da capacidade de resposta a vários estímulos, podendo tornar estes sistemas multifuncionais. O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de microgéis híbridos termossensíveis com capacidade de resposta tanto à temperatura como ao campo magnético aplicado.

Os microgéis híbridos sintetizados por polimerização por emulsão sem tensioativo (polimerização por precipitação) são constituídos por poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) reticulado e quitosano (CS), sendo a componente inorgânica composta por nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (IONPs), previamente sintetizadas por precipitação química. Foram sintetizados microgéis com diferentes percentagens (%m/m) de CS: 2, 10, 15, 20 e 40; bem como com diferentes percentagens (%m/m) de IONPs: 5 e 10%.

Os microgéis sintetizados foram caracterizados de forma a otimizar o seu processo de produção. Para tal foi avaliada a sua estrutura, as propriedades físico-químicas e magnéticas e a capacidade de inchamento dos diferentes microgéis produzidos. Por último, foi avaliado o potencial destes microgéis híbridos funcionarem como agentes de hipertermia magnética.

Confirmou-se que os microgéis obtidos apresentam uma morfologia esférica com diâmetros médios inferiores a um micrómetro. A introdução tanto do CS como das IONPs não alterou a termossensibilidade dos microgéis, embora tenha provocado uma diminuição nas suas capacidades de inchamento. Verificou-se ainda que o encapsulamento das nanopartículas de óxido de ferro não alterou as propriedades superparamagnéticas das mesmas. Estes dados, em conjunto com os resultados de hipertermia magnética, revelam um potencial para a aplicação destes microgéis híbridos em hipertermia magnética.

Termos-chave: Microgéis, PNIPAAm, Quitosano, Nanopartículas magnéticas, Hipertermia.

Abstract

The incorporation of magnetic nanoparticles into thermosensitive polymer matrix allows the development of hybrid systems with potential biomedical applications in diagnostics and therapy. The possible biomedical applications emerge from its ability to respond to more than one external stimulus, making these systems multifunctional. The purpose of the present work is to develop thermosensitive hybrid microgels with the ability to respond both to temperature and to an applied magnetic field.

The hybrid microgels obtained by surfactant free emulsion polymerization are composed of cross-linked poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) and chitosan, being the inorganic part of iron oxide nanoparticles (IONPs), previously produced by chemical precipitation. The composition of the synthesized microgels being the following: 2, 10, 15, 20 and 40 wt. % of chitosan and 5 and 10 wt. % of IONPs.

The hybrid microgels were characterized in terms of structure, physicochemical and magnetic properties and their swelling ability was also analyzed. Finally, their potential as magnetic hyperthermia agents was evaluated.

The produced microgel presented a spherical morphology with a mean diameter below one micrometer. The incorporation of both chitosan and IONPs did not eliminate their thermosensitivity, although their swelling ability was reduced. The incorporation of IONPs into the microgels did not change their superparamagnetic properties. These results, together with the magnetic hyperthermia measurements, confirmed the potential use of the synthesized microgels as magnetic hyperthermia agents.

Keywords: Microgels, PNIPAAm, Chitosan, Magnetic Nanoparticles, Hyperthermia.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
Motivação	1
I. Introdução	3
I.1. Microgéis	3
I.2. Microgéis Termossensíveis	3
I.3. Métodos de Preparação	5
I.3.1. Polimerização por Emulsão	6
I.3.2. Polimerização por Emulsão sem Tensioativo ou Polimerização por Precipitação	7
I.4. Microgéis Híbridos	8
I.5. Hipertermia	9
I.6. Objetivos	13
II. Procedimento Experimental	15
II.1. Síntese dos Microgéis	15
II.1.1. Microgel de PNIPAAm	16
II.1.2. Microgel de PNIPAAm-CS	16
II.1.3. Microgel de PNIPAAm-NPs (Híbrido)	17
II.1.4. Microgel de PNIPAAm-CS-NPs (Híbrido)	17
II.2. Despolimerização do Quitosano	17
II.3. Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro	18
II.4. Técnicas de Caracterização	18
II.4.1. Viscosimetria	18
II.4.2. Determinação da concentração de ferro	19
II.4.3. Hipertermia	19
II.4.4. Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)	20
II.4.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	21
II.4.6. Análise Termogravimétrica (TGA)	21
II.4.7. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	21

II.4.1.	Análise da morfologia por TEM	22
II.4.2.	Sistema Supercondutor de Interferência Quântica (SQUID)	22
III.	Análise de Resultados	23
III.1.	Caraterização das nanopartículas magnéticas.....	23
III.2.	Despolimerização do quitosano	24
III.3.	Caraterização dos microgéis	24
III.3.1.	Estrutura	25
(1)	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	25
(2)	Propriedades térmicas. Determinação do conteúdo de NPs (TGA).....	26
III.3.2.	Morfologia	28
III.3.3.	Propriedades de Inchamento	31
III.3.4.	Propriedades magnéticas (SQUID).....	32
III.4.	Hipertermia magnética.....	33
IV.	Discussão de Resultados	35
V.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	37
VI.	Bibliografia.....	39

Índice de Figuras

Figura I.1 - Transição de volume dos microgéis, face à temperatura, que atua como estímulo externo. Adaptado de [9].	4
Figura I.2 - Estrutura química do poli(N-isopropilacrilamida).	4
Figura I.3 - Efeito da temperatura na transição de fase do PNIPAAm. Adaptado de [21].	5
Figura I.4 - Mecanismo de preparação dos géis por polimerização por precipitação. Adaptado de [40].	7
Figura I.5 - Exemplo de sistema terapêutico multifuncional, onde se aplica e monitoriza a libertação de um fármaco bem como ocorre um tratamento hipertérmico simultaneamente. Adaptado de [62].	9
Figura II.1 - Componente do equipamento de hipertermia utilizado e respetivo pormenor do seu interior, onde se verifica o local onde é colocada a amostra (a branco) e a sua distância à bobine. Adaptado de [84].	20
Figura III.1 – a) Difractograma de DRX das nanopartículas de Fe_3O_4 ; b) Espectro de FTIR das nanopartículas de Fe_3O_4 [81].	23
Figura III.2 – Imagem de Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento, produzidas por precipitação química.	24
Figura III.3 - Espectro de FTIR de NIPAAm e microgel de PNIPAAm sintetizado.	25
Figura III.4 - Espectro de FTIR do CS despolimerizado e dos microgéis de PNIPAAm-CS e Híbrido sintetizados.	26
Figura III.5 - Termogramas dos microgéis sem NPs (A) e dos microgéis híbridos (B), e as respetivas derivadas (C e D).	27
Figura III.6 - Imagens de SEM obtidas de amostras dos microgéis sintetizados: PNIPAAm (a,b), PNIPAAm-CS 20% (c,d), PNIPAAm-CS 40% (e,f), PNIPAAm-CS 20% 10% NPs (g,h). À esquerda encontram-se as imagens com uma escala de 200 nm e à direita com 100 nm.	30
Figura III.7 - (A) Diâmetro Hidrodinâmico e (B) Inchamento relativo das partículas dos microgéis de: PNIPAAm (quadrados pretos), PNIPAAm-CS 20% (circunferências), PNIPAAm-CS 40% (triângulos) e híbrido (quadrados azuis).	32
Figura III.8 – Representação das curvas de ZFC (figuras sem preenchimento) e FC (figuras com preenchimento) para a amostra de NPs e para os microgéis híbridos com 10% de NPs.	33
Figura III.9 – Magnetização em função do campo aplicado para a amostra de NPs e para os microgéis híbridos com 10% de NPs.	33
Figura III.10 - Calor originado pelas Amostras: PNIPAAm-CS 20% com 5% e 10 % NPs e PNIPAAm-CS 40% com 10 % NPs.	34

Índice de Tabelas

Tabela I.1 - Aplicações de Sistemas híbridos de acordo com a componente inorgânica que possuem.	8
Tabela II.1 - Composição dos microgéis de PNIPAAm e PNIPAAm-CS sintetizados.	16
Tabela II.2 - Composição dos microgeles de PNIPAAm-NPs e PNIPAAm-CS-NPs sintetizados.	17
Tabela III.1 - Percentagens de resíduo final e de nanopartículas teórica e real nos microgéis, obtidas através dos resultados de TGA.....	28
Tabela III.2 - Tamanho médio e Desvio Padrão das partículas das amostras dos microgéis de PNIPAAm, PNIPAAm-CS 20%, PNIPAAm-CS 40% e PNIPAAm-CS 20% 10% NPs.	29
Tabela III.3 – Valores de ILP das nanopartículas e dos microgéis de PNIPAAm-CS-NPs sintetizados.....	34

Lista de Abreviaturas

CMC	Concentração Micelar Crítica
CS	Quitosano
DA	Grau de desacetilação
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DRX	Difração de Raios x
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
ILP	Perda de Potência Intrínseca
IONPs	Nanopartículas de Óxidos de Ferro
LCST	Temperatura de Solução Crítica Mínima
PCL	Poli-caprolactona
PEG	Polietileno glicol
PEO	Polioxietileno
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicolídico)
PNIPAAm	Poli (N-isopropilacrilamida)
PVA	Álcool polivinílico
SAR	Rácio Específico de Absorção
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
SFEP	Polimerização por Emulsão sem Tensioativo
SPIONs	Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas
SQUID	Sistema Supercondutor de Interferência Quântica
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
UCST	Temperatura de Solução Crítica Máxima
VPTT	Transição de Volume associada à Temperatura

Motivação

A ciência aplicada que integra conhecimentos das Ciências Naturais e de Engenharia para o processamento de materiais e substâncias por agentes biológicos, para a obtenção de produtos e serviços designa-se por Biotecnologia. Neste sentido, a biotecnologia tem sido utilizada para resolver problemas e criar produtos de utilidade.

Nas últimas décadas os avanços na área da medicina têm-se traduzido no surgimento de novos materiais ou em novas aplicações para os já existentes. Neste sentido, os microgéis surgem como uma nova aplicação para os polímeros já existentes. O futuro na área dos microgéis termossensíveis foca-se no desenvolvimento de sistemas multifuncionais, ou seja, sistemas que sejam sensíveis a mais do que um estímulo externo e com mais do que uma função. O desenvolvimento deste tipo de sistemas permite aumentar a gama de aplicação destes materiais. Assim, os microgéis híbridos têm surgido como uma opção para o desenvolvimento deste tipo de sistemas. Os microgéis híbridos podem ser obtidos através da incorporação de diferentes materiais na estrutura porosa do microgel, como por exemplo: proteínas ou nanopartículas constituídas por materiais semicondutores, metais ou seus óxidos. A incorporação destes materiais na estrutura do microgel permite adicionar ao sistema características do material incorporado, como: condutividade, propriedades magnéticas ou atividade catalítica.

A incorporação de nanopartículas de óxidos metálicos (como a magnetite) confere propriedades aos microgéis híbridos que permite a sua aplicação: na obtenção de imagens médicas por ressonância magnética, biossensores, libertação controlada de fármacos, medicina regenerativa e hipertermia [1-3].

Assim, o desenvolvimento do atual trabalho foi ponderado tendo em conta a funcionalidade dos microgéis na área biomédica e na sua contribuição para o aumento da eficácia e eficiência, quer do diagnóstico como dos tratamentos médicos.

Este trabalho pretende ser mais uma contribuição para o desenvolvimento de microgéis híbridos compostos por um polímero termossensível no qual são incorporadas nanopartículas de magnetite, para que este sistema possa ser utilizado em aplicações como a libertação controlada de fármacos e a hipertermia magnética.

I. Introdução

I.1. Microgéis

Os microgéis foram mencionados pela primeira vez em 1949 por Baker [4], num artigo intitulado “Microgel, A new Molecule” e caracterizam-se por serem coloides que apresentam uma estrutura intramolecularmente reticulada, tendo um caráter intermédio entre os sistemas ramificados e os reticulados macroscopicamente. Podem ter uma dimensão entre 100nm a 1000nm e possuem um peso molecular semelhante aos polímeros lineares de alto peso molecular, embora sejam definidos como sistemas de peso molecular infinito [5]. Os microgéis podem ser agrupados em físicos ou químicos, de acordo com o tipo de reticulação que as suas partículas apresentam. No caso dos microgéis físicos, a formação e manutenção da estrutura interna dos géis está associada a tipos de forças e interações (iónicas e hidrofóbicas) que possuem um caráter reversível, enquanto os microgéis químicos possuem um entrecruzamento geralmente mediado por ligações covalentes, por isso, possui um caráter definitivo e mais estável do que os microgéis físicos [6].

Devido ao menor tamanho os microgéis apresentam várias vantagens comparativamente aos hidrogéis (macrogéis), nomeadamente: i) resposta mais rápida a um estímulo externo, ii) boa estabilidade coloidal, iii) maior área disponível para bioconjugação pelo fato de apresentarem um maior rácio área/volume, iv) rede interna ampla cujas características podem ser facilmente manipuláveis tendo em conta os parâmetros de síntese, e por último v) o menor tamanho facilita a sua administração de um modo menos invasivo [7].

Os microgéis possuem uma capacidade de resposta a diferentes estímulos externos, tais como: pH, força iónica do meio envolvente, qualidade do solvente, exposição a um campo magnético ou à temperatura. Sendo que, face aos outros estímulos, os microgéis que reagem à temperatura tratam-se dos mais reportados na literatura [6].

I.2. Microgéis Termossensíveis

Os microgéis termossensíveis possuem a capacidade de responderem a mudanças de temperatura, sofrendo alterações conformacionais na sua estrutura. Em resposta a este estímulo, os polímeros passam a interagir de forma diferente com as moléculas de água presentes, o que culmina na formação ou disrupção de interações electrostáticas e hidrofóbicas que ocorrem intra e intermolecularmente, entre as cadeias do polímero. Tal irá provocar uma mudança no volume do polímero, sendo o ponto de transição designado por transição de fase de volume associada à temperatura (VPTT), como presente na Figura I.1 [8].

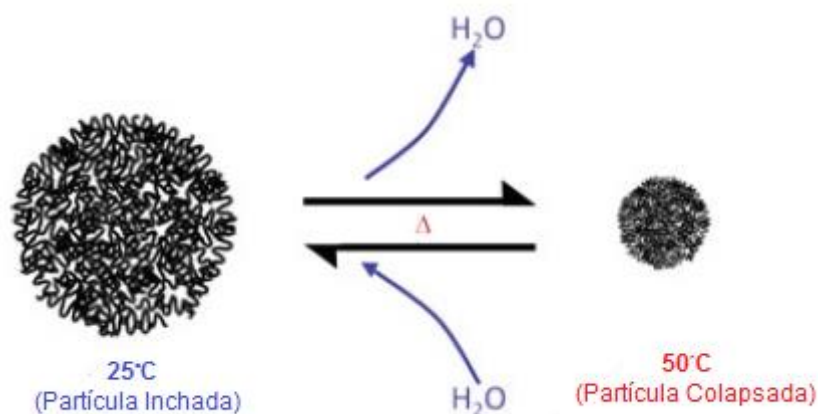


Figura I.1 - Transição de volume dos microgéis, face à temperatura, que atua como estímulo externo. Adaptado de [9].

Assim, consoante a natureza do polímero estes podem apresentar uma resposta positiva com uma transição do tipo UCST (*Upper Critical Solution Temperature*) que resulta na hidratação do polímero com o aumento da temperatura, ou uma resposta negativa com uma transição LCST (*Lower Critical Solution Temperature*), em que se dá uma diminuição de volume do microgel com o incremento da temperatura [10]. Como exemplo de microgéis com transição UCST está o sistema formado por poli (acrilamida-ácido acrílico) [11]. Polímeros como o polietileno glicol, polióxido de etileno, poli (ácido láctico-co-glicólico) [12], bem como monómeros de N,N-dietilacrilamida [13], N-vinil caprolactona (NVCL) [14] ou N-isopropilacrilamida (NIPAAm) [15-17], possuem uma transição do tipo LCST.

Um dos polímeros termossensíveis que tem recebido mais atenção da comunidade científica, desde que foi sintetizado pela primeira vez em 1986 por Pelton e Chibante é o Poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), que possui grupos funcionais acrilamida e isopropilo, como representado na Figura I.2 [18].

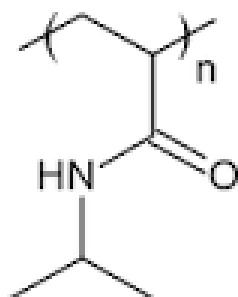


Figura I.2 - Estrutura química do poli(N-isopropilacrilamida).

O PNIPAAm apresenta uma LCST entre os 30-32°C em solução aquosa [19]. A Figura I.3 representa o comportamento do PNIPAAm: abaixo da LCST os seus grupos funcionais hidrofílicos (acrilamida) estabelecem interações (pontes de hidrogénio intermoleculares) com a água, por isso, o polímero está hidratado e no seu estado inchado; acima da LCST as pontes de hidrogénio são quebradas e passam a ser os resíduos hidrofóbicos (isopropilo) a dominar as interações (pontes de hidrogénio intramoleculares). Deste modo, com o aumento da temperatura, o polímero sofre uma transição *coil-to-globule*, passando a estar no seu estado desinchado [8]. Esta transformação, que ocorre com o aumento da temperatura, é favorecida pelo aumento de entropia do sistema devido ao aumento de graus de liberdade das moléculas de água ao quebrarem as interações por pontes de hidrogénio com as cadeias poliméricas [20].

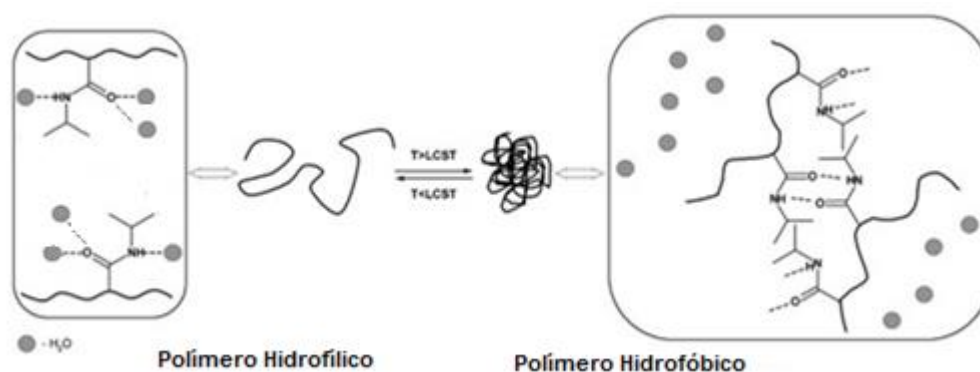


Figura I.3 - Efeito da temperatura na transição de fase do PNIPAAm. Adaptado de [21].

Bouillot e Vincent [22] foram pioneiros na produção de microgéis termossensíveis baseados em monómeros de NIPAAm, sendo seguidos por Saunders [23], Richtering [24, 25] e Lyon [26]. No entanto, além da termossensibilidade e da LCST próxima à temperatura corporal humana, o PNIPAAm ainda apresenta outras características, como o fato de ser biocompatível, biodegradável e possuir vários grupos funcionais que permitem a bioconjugação. Por outro lado, é possível conferir-lhe características adicionais, provenientes da sua combinação com outros monómeros ou polímeros, fazendo-o por exemplo responder a outros estímulos, tais como: o pH [27, 28], a luz [29] ou outros [30].

I.3. Métodos de Preparação

O microgel pode ser preparado usando diferentes técnicas como: emulsão [31], *spray drying* [32], litografia [33], *layer-by-layer* [34], coacervação [35], microfluídica [36] ou com recurso a fluídos supercríticos [37].

Carothers (1931) e mais tarde de Flory (1941) perceberam através dos seus estudos, que o crescimento dos géis ocorre em três dimensões e de forma ilimitada. Assim, para se sintetizar microgéis de tamanho coloidal, conhecidos como “latexes”, seria necessário reduzir o recipiente, isto é, o tamanho da gota onde ocorre a reação. Deste modo, o método mais aplicado para a obtenção de microgéis é a polimerização por emulsão.

1.3.1. Polimerização por Emulsão

Segundo Becker [38], uma emulsão é um sistema heterogêneo constituído por pelo menos um líquido imiscível intimamente dispersa num outro líquido sob a forma de gotículas, cujo diâmetro em geral não excede os 0,1 μm . Tais sistemas apresentam um mínimo de estabilidade, a qual pode ser aumentada pela adição de substâncias como agentes tensioativos ou sólidos finamente divididos. As emulsões podem ser de dois tipos: óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). No primeiro caso, temos gotículas de óleo (fase dispersa, descontínua ou interna) dispersas em água (fase dispersante, contínua ou externa). No segundo caso temos o inverso.

A polimerização por emulsão é tipicamente constituída por moléculas de monómero, um iniciador, água e um agente tensioativo que constitui a fase orgânica (ou dispersa), enquanto, os restantes compostos fazem parte da fase aquosa (ou contínua). Na emulsão algumas moléculas de monómero irão estar dissolvidas na fase aquosa, outras estarão conjugadas com o tensioativo, formando micelas com 5-10 nm de diâmetro, desde que a concentração do tensioativo na fase aquosa seja superior à concentração crítica de formação de micelas (CMC). No entanto, a maioria do monómero estará em partículas, designadas por “reservatórios de monómero” com 1-10 μm de diâmetro. A polimerização começa quando o iniciador é adicionado à emulsão. Após a sua decomposição, formam-se radicais livres na fase aquosa, que serão internalizados, tal é a característica mais distintiva das emulsões e permitirá que os radicais não reajam entre si, terminando a reação, e por isso, que a taxa de polimerização seja superior. A internalização dos radicais nas micelas é potenciada pelo fato de estas possuírem uma área interfacial óleo/água elevada e o meio aquoso facilitar a agitação e a transferência de massa. A polimerização das cadeias irá ocorrer, formando-se oligómeros, que à medida que atingem um comprimento crítico tornam-se demasiado hidrófobos e acabam por entrar para dentro das micelas. Deste modo, vão se formando partículas precursoras, que irão funcionar como novos “reatores” para a polimerização, sendo que à medida que esta ocorre as partículas vão crescendo e acabam por transformar-se em partículas poliméricas. Após esta primeira etapa, designada por nucleação, a formação de novas partículas e a velocidade de polimerização permanecem constantes; à medida que se vão esgotando as moléculas de monómero, a taxa de polimerização diminui e o processo encaminha-se para a última etapa, a finalização [39]. No final as partículas poliméricas obtidas possuem um diâmetro final compreendido entre os 50 e 150 nm [40].

I.3.2. Polimerização por Emulsão sem Tensioativo ou Polimerização por Precipitação

Em 1965 Matsumoto e Ochi [41] mostraram ser possível obter latex monodispersos na ausência de um agente tensioativo, utilizando um iniciador iônico. Este trata-se do método de polimerização mais empregue para a síntese de microgéis termossensíveis. Como ocorre na ausência de um tensioativo é necessário que o meio possua uma elevada constante dielétrica, por isso, geralmente ocorre em meio aquoso e a 60-70°C, que é a temperatura de decomposição do iniciador. Por outro lado, a estabilidade também ficará a cargo de forças repulsivas electroestáticas entre as próprias partículas formadas, sobretudo quando estas são maiores do que 100 nm, através da presença de grupos químicos existentes na sua superfície, que resultam da degradação do iniciador.

Na Figura I.4 encontra-se o processo de polimerização por precipitação. Após a formação dos radicais livres que irão “atacar” os monómeros, ocorre uma fase de nucleação mais curta que na emulsão convencional, tal permitirá obter partículas poliméricas com maior homogeneidade de tamanho e menor peso molecular. Posteriormente à nucleação, as cadeias poliméricas irão crescendo formando oligómeros, que ao atingirem um tamanho crítico acabam por precipitar, uma vez que a temperatura a que a reação ocorre é superior à LCST do polímero. A polimerização termina, retirando-se a fonte de calor ou permitindo a entrada de oxigénio, por exemplo. No final, dependendo das condições (temperatura, velocidade de agitação...) em que a reação é levada a cabo, obtém-se partículas poliméricas entre os 100-1000 nm [42, 43].

Em 1978 Chibante foi o primeiro a utilizar esta técnica para sintetizar microgéis de PNIPAAm.



Figura I.4 - Mecanismo de preparação dos géis por polimerização por precipitação. Adaptado de [40].

I.4. Microgéis Híbridos

Os microgéis híbridos caracterizam-se por possuírem uma componente orgânica polimérica e uma componente inorgânica constituída por nanopartículas metálicas [44]. A capacidade dos microgéis funcionarem como agentes transportadores da componente inorgânica, foi demonstrada por Zhang *et al.* [45], sendo que, a introdução desta componente aos microgéis confere-lhes características: reológicas, óticas, elétricas e magnéticas únicas; que permitem aumentar o seu potencial de aplicação [46]. Deste modo, combinando um dado polímero com diferentes tipos de nanopartículas metálicas é possível obter um sistema com várias aplicações. Na Tabela I.1 estão algumas das aplicações de sistemas poliméricos híbridos, em função do tipo de nanopartículas utilizadas.

Tabela I.1 - Aplicações de sistemas híbridos de acordo com a componente inorgânica que possuem.

Nanopartícula Metálica	Principais Aplicações	Referência
Ouro (Au)	Biossensores, <i>Biolabelling</i> , Obtenção de Imagens Médicas, Bio-separação	[47] [48] [49]
Prata (Ag)	Agente Antimicrobiano, Catalisador	[50] [51]
Paládio (Pd)	Biossensores, Biorremediação	[52]
Óxidos de Ferro (Fe_3O_4)	Obtenção de imagens médicas, Libertação controlada de fármacos, Hipertermia, Engenharia de tecidos	[53] [54] [55]

Para sintetizar microgéis híbridos existem na literatura duas abordagens mais comuns. Uma delas passa pela síntese das nanopartículas *in situ*, ou seja, aquando da polimerização do microgel, como estudado por Korotych *et al.* [56] e realizado pelo grupo de Kumacheva [57]. A segunda consiste em psintetizar previamente as nanopartículas e adiciona-las ao meio onde irá ocorrer a polimerização, após sofrerem um tratamento prévio, como os realizados nos trabalhos de Liz-Márzan [58] e Shoukuan Fu [59]. No entanto, Pich *et al.* [60] sintetizaram partículas de poliestireno (PS) e poli(acetoacetoxietil metacrilato) (AAEM) por SFEP, com nanopartículas de óxido de ferro produzidas previamente, por precipitação química e adicionadas ao meio de polimerização, sem nenhum tipo de tratamento prévio. Deste modo, torna-se mais clara a possibilidade de sintetizar um sistema híbrido sem recurso a técnicas mais morosas e que elevariam o custo de produção.

A introdução de nanopartículas nos microgéis de PNIPAAm aumenta a sua aplicabilidade e funcionalidade, sobretudo a nível biomédico. Tal reflete-se na possibilidade de serem empregues: i) no diagnóstico para a obtenção de imagens médicas, ii) em engenharia de tecidos, iii) para libertação controlada de fármacos [61] e iv) hipertermia. Na Figura I.5 está esquematizado o potencial de aplicação de um sistema híbrido contendo nanopartículas magnéticas.

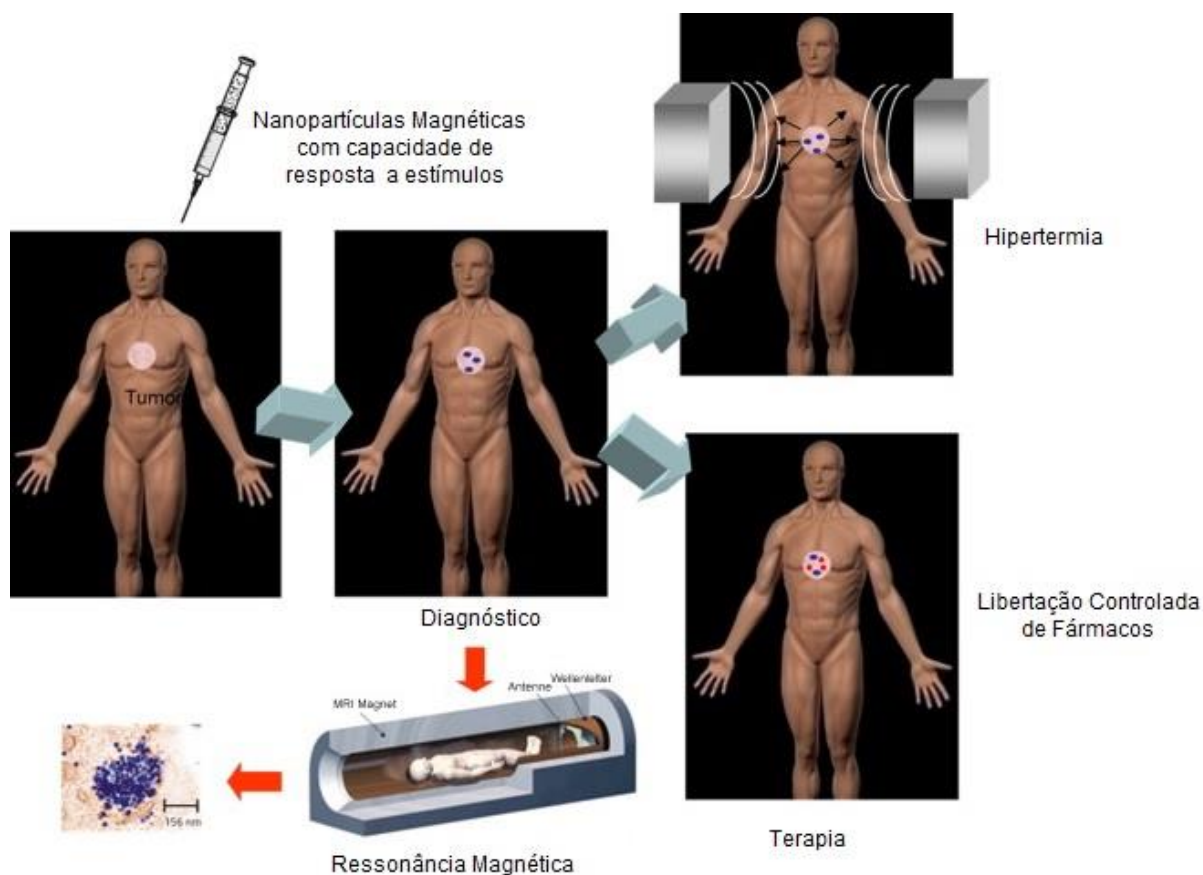


Figura I.5 - Exemplo de sistema terapêutico multifuncional, onde se aplica e monitoriza a libertação de um fármaco bem como ocorre um tratamento hipertérmico simultaneamente. Adaptado de [62]

I.5. Hipertermia

A hipertermia consiste num aumento local ou regional da temperatura corporal, pelo uso de um método artificial [63] e pode ser realizada a partir de vários métodos: i) por radiofrequência com dispositivos externos que permitem uma boa penetração nos tecidos, ii) por perfusão que se trata do método mais simples e básico, iii) por frequência potenciada que consiste na aplicação de calor com um cateter, iv) por recurso a partículas ferroelétricas ou magnéticas e por último v) por uso de nanopartículas magnéticas. Contudo, só as últimas duas técnicas mencionadas, que constituem a hipertermia magnética, são específicas para um dado local, o que permite uma redução dos efeitos colaterais nos tecidos saudáveis. Uma vez que, um sistema terapêutico ideal baseado em hipertermia consiste em gerar calor de forma localizada no local a tratar não afetando os tecidos circundantes [64].

Um dos primeiros estudos em hipertermia magnética foi realizado em 1957 quando Gilchrist *et al.* [65] utilizaram nanopartículas para gerar calor num nódulo linfático, expondo-o a um campo magnético externo.

Na hipertermia magnética pode-se utilizar diferentes tipos de nanopartículas como as de ouro ou óxidos de ferro [66]. As nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) são as mais utilizadas uma vez que possuem um diâmetro médio entre os 50 e os 100 nm, o que as torna ideais para serem administradas por via intravenosa. Por outro lado, também possuem outras propriedades físicas e químicas como: um elevado rácio área/volume, baixa toxicidade e biocompatibilidade, além de baixa adsorção de proteínas [67, 68].

Tendo em conta a quantidade de calor gerado, a hipertermia magnética pode ser classificada em termoablação (acima dos 46°C), moderada (entre os 41-46°C) e diatermia (menos de 41°C). A termoablação causa de forma direta morte celular e necrose do tecido; a diatermia é normalmente utilizada em doenças do foro reumatológico e a hipertermia moderada, que consiste no tipo de tratamento mais utilizado, é comumente utilizada na sensibilização de células cancerígenas para os efeitos da radioterapia e quimioterapia. Uma vez que, estas células são mais sensíveis ao calor, pois não conseguirão impedir a ativação e/ou inativação de diferentes mecanismos intra e extracelulares, que provocarão danos celulares irreversíveis como: problemas de enrolamento e desnaturação de proteínas, agregação no ADN, expressão de proteínas de choque e indução e/ou regulação de apoptose [69, 70].

Uma forma de medir o calor gerado pelas nanopartículas é utilizando o SAR (Rácio Específico de Absorção) ou SPA (Absorção de Energia Específica), determinado pela equação 1, que mede a quantidade de calor gerado por unidade do material biológico. O ILP (Perda de Potência Intrínseca), calculado pela equação 2, é obtido através do SAR ou SPA e é um parâmetro independente da frequência e intensidade do campo magnético aplicado na medição das amostras. Assim, o ILP possibilita a comparação entre amostras que foram submetidas a campos magnéticos condições [71].

$$SPA = \frac{m_{NPS} \times c_{NPS} + m_L \times c_L}{m_{NPS}} \times \left(\frac{dT}{dt} \right)_{max} \quad (\text{Equação 1})$$

$$ILP = \frac{SPA}{f \times (H_0)^2} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde m_{NPS} e c_{NPS} referem-se à massa e calor específico das nanopartículas, respetivamente. m_L e c_L são, pela mesma ordem, a massa e calor específico do líquido onde as nanopartículas estão dispersas. $\left(\frac{dT}{dt} \right)_{máx.}$ corresponde à variação de temperatura máxima, isto é, ao declive da curva de temperatura gerada pela amostra em função do tempo. O ILP é calculado pela divisão do valor de SPA, pela frequência do campo magnético aplicado (f), vezes a intensidade desse campo magnético $(H_0)^2$.

Para poder ser aplicado a nível biomédico, nomeadamente em hipertermia magnética, o microgel sintetizado terá que possuir algumas características essenciais, tais como: boa dispersão de tamanho, nanopartículas magnéticas encapsuladas superparamagnéticas e com uma dimensão homogênea, biodegradabilidade e biocompatibilidade, para tal a percentagem de monómero

(NIPAAm) terá que ser inferior a 0,2% [72], como definido pela FDA (*Food and Drug Administration*). Por outro lado, caso o microgel seja projetado para ser administrado por via intravenosa, este deverá possuir um tamanho entre os 100 e os 500 nm, de modo a possuir um tempo de circulação favorável sem o prejuízo de poder causar embolias. Sendo que, os microgéis com tamanho superior poderão ser utilizados para o tratamento de tumores sólidos, sendo injetados diretamente nestes.

Vários autores reportaram estudos na área de hipertermia magnética, como Jordan *et al.* que testou o efeito da hipertermia em diferentes tipos de cancro, nomeadamente: próstata [73, 74], glioblastoma [75] ou mama [76]. Sadhunkha *et al.* reportam dois estudos onde usam hipertermia magnética para o tratamento de células germinais cancerígenas [77] e cancro do pulmão [78]. Por último, Yanase e os seus colaboradores aplicaram lipossomas catiónicos com nanopartículas em ratinhos [79].

I.6. Objetivos

Tendo em conta o estado da arte apresentado anteriormente, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método de preparação de microgéis híbridos termossensíveis com resposta a múltiplos estímulos como a campo magnético e a temperatura aplicada, por uma metodologia mais simples. Este desenvolvimento inclui o estudo das propriedades dos microgéis em função da sua composição e a sua aplicação em hipertermia magnética.

Sendo que para atingir este objetivo principal, pretende-se atingir os seguintes objetivos específicos:

- Preparação e caracterização de microgéis de PNIPAAm-Quitosano (PNIPAAm-CS), utilizando a técnica de polimerização por emulsão sem tensioativo;
- Preparação e caracterização de microgéis híbridos (PNIPAAm-CS-NPs), utilizando a mesma técnica;
- Estudo do efeito da quantidade de quitosano no encapsulamento de nanopartículas magnéticas no microgel híbrido;
- Estudo do efeito do quitosano e das nanopartículas magnéticas nas propriedades de inchamento e na hipertermia magnética.

II. Procedimento Experimental

Neste capítulo são descritos os procedimentos utilizados tanto para as sínteses como para a caracterização dos materiais.

Foram sintetizados microgéis de PNIPAAm, PNIPAAm-CS e com nanopartículas (híbridos) por polimerização por emulsão sem tensioativo. O CS utilizado nos microgéis foi previamente despolimerizado, e as nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas recorrendo ao método de precipitação química.

Para a caracterização dos materiais obtidos, foram utilizadas as seguintes técnicas: viscosimetria, espectrofotometria, hipertermia, DLS, FTIR, TGA, TEM, SEM e SQUID.

II.1. Síntese dos Microgéis

Os microgéis de PNIPAAm e PNIPAAm-CS foram preparados mediante a técnica da emulsão sem tensioativo, também conhecida como polimerização por precipitação. Neste caso ocorre uma polimerização radical que se inicia após decomposição térmica do iniciador iónico APS. O radical formado inicia a cadeia ao reagir com um monómero solúvel em água (NIPAAm) e o processo continua com a propagação das cadeias até que estas atinjam um tamanho crítico. Se o tamanho atingido exceder o limite de solubilidade do solvente, as cadeias colapsam e produzem partículas precursoras. O colapso acontece pelo fato da temperatura de polimerização ser superior à temperatura de transição de volume, a LCST do polímero. Estas partículas precursoras poderão precipitar como partículas coloidais estáveis ou, por outro lado, podem agregar-se a outras partículas precursoras, formando partículas de maior tamanho e mais estáveis, que a partir de um dado tamanho precipitam.

Materiais:

O monómero N-isopropilacrilamida (NIPAAm) utilizado neste estudo é um produto comercial, com uma pureza de 97% ($(C_6H_{11}NO)_n$, Aldrich Chemistry). O quitosano utilizado foi previamente despolimerizado para se obter um peso molecular de 50-100 *KDa* (ver método de despolimerização), sendo dissolvido em ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$, Panreac). Utilizou-se o iniciador iónico persulfato de amónia (APS, $(NH_4)_2S_2O_8$) e como agente reticulante N,N'-Metilenebisacrilamida (MBAA) com uma pureza do 97%, sendo ambos os produtos da casa comercial Sigma-Aldrich. O persulfato de sódio (SBS) ($Na_2S_2O_8$, Acrös Organics) foi usado como catalisador da reação e constituindo a fase contínua utilizou-se água destilada.

II.1.1. Microgel de PNIPAAm

Para a síntese dos microgéis de PNIPAAm preparam-se separadamente soluções de NIPAAm/H₂O, MBA/H₂O, APS/H₂O e SBS/H₂O para facilitar a dissolução dos reagentes antes de serem adicionados ao balão, sendo o volume total de água destilada usada de 100ml. Posteriormente coloca-se num balão de três bocas as soluções já preparadas de NIPAAm e de MBAA e agita-se a 400-500 rpm durante 30 minutos, fazendo simultaneamente uma purga de azoto. Após este tempo, mergulha-se o balão num banho de óleo a 70 °C, e introduz-se a solução de APS. Ao fim de uma hora da adição do APS acrescenta-se o catalisador (SBS). A reação prossegue durante mais quatro horas em atmosfera inerte, mantendo-se o aquecimento e a agitação. Após as 5 horas de reação, deixa-se o sistema atingir a temperatura ambiente, mantendo-se a agitação para prevenir a formação de aglomerados nesta etapa de terminação.

O produto obtido é purificado mediante a diálise convencional onde a água mili-Q é mudada quatro vezes ao dia, para a eliminação de monómero residual.

II.1.2. Microgel de PNIPAAm-CS

Para a síntese de microgel de PNIPAAm-CS são preparadas as soluções aquosas de iniciador, catalisador e reticulante, do ponto II.1.1. Na véspera, para garantir que fica completamente dissolvido, coloca-se a respetiva quantidade de quitosano em 50 ml de ácido acético 1% (v/v), sob agitação magnética.

Introduz-se num balão de três bocas as soluções já preparadas de NIPAAm e CS e agita-se a 400-500 rpm durante 30 minutos. Mantendo a agitação, adiciona-se a solução de MBAA e efetua-se uma purga com azoto durante trinta minutos. A partir desta etapa, o procedimento da síntese ocorre como o descrito em II.1.1.

Tabela II.1 - Composição dos microgéis de PNIPAAm e PNIPAAm-CS sintetizados.

Reação	NIPAAm (g)	CS		MBAA		APS		SBS	
		%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
PNIPAAm	1	--	--	10	100	25	25	0,5	5
PNIPAAm-CS2		2	20						
PNIPAAm-CS10		10	100						
PNIPAAm-CS15		15	150						
PNIPAAm-CS20		20	200						
PNIPAAm-CS40		40	400						

*As percentagens são em relação ao peso de NIPAAm utilizado.

II.1.3. Microgel de PNIPAAm-NPs (Híbrido)

Para a obtenção de microgéis híbridos de PNIPAAm-NPs é utilizada a mesma técnica de polimerização – polimerização por precipitação, sendo utilizados os mesmos reagentes e acrescentando-se nanopartículas magnéticas ao sistema. As NPs são adicionadas à solução de NIPAAm e sonicadas durante 30 segundos. Após esta etapa, a reação ocorre como descrito no ponto II.1.1.

II.1.4. Microgel de PNIPAAm-CS-NPs (Híbrido)

Para a síntese destes microgéis híbridos, as nanopartículas magnéticas são dispersas na solução de quitosano em ácido acético a 1% (v/v), seguido por sonicação durante 30 segundos. Posteriormente, a solução de CS com Fe₃O₄ NPs é adicionada ao balão conjuntamente com a solução de monômero, para que se seguir o procedimento já descrito no ponto II.1.1

Tabela II.2 - Composição dos microgeles de PNIPAAm-NPs e PNIPAAm-CS-NPs sintetizados.

Reação	NIPAAm (g)	CS		NPs		MBAA		APS		SBS	
		%	mg	%	ml	%	mg	%	mg	%	mg
PNIPAAm-5%NPs	1	--	--	5	2	10	100	25	25	0,5	5
PNIPAAm-CS20 5%NPs		20	200	10	4						
PNIPAAm-CS20 10%NPs				5	3,7						
PNIPAAm-CS40 5%NPs				10	1,9						
PNIPAAm-CS40 10%NPs		40	400								

II.2. Despolimerização do Quitosano

De forma a obter quitosano com um peso molecular entre 50 e 100 *kDa* utilizou-se nitrito de sódio para despolimerizar o quitosano comercial, com um peso molecular de 470 *kDa*. [80]

Materiais:

Ácido acético glacial (C₂H₄O₂, Panreac), Quitosano ((C₈H₁₃NO₅)_n, Cognis) e Nitrito de Sódio (NaNO₂, EKA).

Procedimento:

Foi preparada 500 ml de uma solução de quitosano a 1% (m/v) em ácido acético 2% (v/v), e colocada em agitação mecânica a 750-1000 rpm. A esta solução adiciona-se 10 ml de uma solução de nitrito

de sódio a 15 mg/ml, reagindo durante uma hora. Posteriormente é adicionada gota a gota uma solução de hidróxido de sódio 4M, até se obter um pH aproximadamente de oito, que indicará que todo o quitosano precipitou. Segue-se a centrifugação (Heraeus Multifuge, X1R centrifuge) a 10 000 rpm durante 20 minutos, 25°C e posterior lavagem com água destilada. No final, o polímero obtido é congelado e liofilizado (VaCO₂, Zirbus Technology) durante 24h.

II.3. Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro

As nanopartículas de óxido de ferro podem ser sintetizadas por vários métodos como a decomposição térmica e a precipitação química que é simples, rápida, com baixos custos e que produz uma elevada concentração de nanopartículas por síntese. Deste modo, a precipitação química foi o método escolhido para a síntese das nanopartículas, sendo o método descrito e otimizado por Alves A. [81], que também procedeu à caracterização das nanopartículas.

Materiais:

Cloreto de Ferro (II) Tetrahidratado (Sigma- Aldrich), Cloreto de Ferro(III) Hexahidratado (Sigma- Aldrich), Amónia a 25% (NH₃, Panreac).

Procedimento:

1,35g de FeCl₃·6H₂O e 0,50g de FeCl₂·4H₂O são dissolvidos em 100 ml de H₂O destilada, dentro de um balão de três bocas. A mistura fica em forte agitação, 1200 rpm, sob atmosfera de azoto para prevenir a oxidação, até que os sais se dissolvam. Posteriormente, mantendo a agitação, são adicionados 10 ml de uma solução aquosa de amónia a 25%, terminando a reação após cinco minutos. Para a purificação das nanopartículas, estas são colocadas sob um magnete sendo utilizada água Milli-Q para as sucessivas lavagens, até que o pH fique neutro.

II.4. Técnicas de Caracterização

II.4.1. Viscosimetria

A determinação do peso molecular pode ser feita através da medição da viscosidade diluída, que irá estar relacionada com o comprimento da cadeia do polímero. Sendo que, a relação entre viscosidade e massa molecular, provém da equação de Mark-Houwink (eq. 3).

$$[\eta] = K[Mv]^\alpha \quad (\text{Equação 3})$$

Onde η representa a viscosidade intrínseca e M_v o peso molecular médio do polímero, sendo α e k constantes, determinadas em 0,97 e $2,14 \times 10^{-5}$, respetivamente, quando se utiliza como solvente ácido acético 0,2M/acetato de sódio 0,1M a 30°C a partir das equações (eq. 4) e (eq. 5). [82]

$$a = 0,6202 + \frac{0,699x}{0,4806+x} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\log K \times 10^{-5} = (-5,7676 \times a) + 5,9232 \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo x igual a $\frac{DA}{pH \times \mu}$, com DA o grau de desacetilação do quitosano, pH da solução do solvente utilizado com uma força iónica designada por μ .

II.4.2. Determinação da concentração de ferro

A concentração de ferro na suspensão de nanopartículas de óxido de ferro foi determinada pelo método colorimétrico com 1,10-Fenantrolina [83]. Assim, a 40 μ l da amostra de nanopartículas diluída, adiciona-se 20 μ l HCl (37%), que irá dissolver o ferro. Após uma hora à temperatura ambiente são adicionados: 100 μ l de hidroxilamina (100 mg/ml) que reduzirá o ferro de III para II, 500 μ l de 1,10- fenantrolina monohidratada (3 mg/ml) e 1140 μ l de acetato de amónia (500 Mm). Seguidamente, recorrendo a espectrofotometria de UV-VIS, mediu-se a absorvância das amostras a 510 nm.

A curva de calibração foi efetuada utilizando o sulfato de amónia e ferro (II) numa gama de concentração dos 10 aos 1000 μ g/ml.

Posteriormente, os resultados obtidos relacionam-se com a concentração de nanopartículas, através da equação (eq. 6) obtida experimentalmente:

$$[\text{Fe}] = 0,7 \times [\text{NPs}] \quad (\text{Equação 6})$$

Onde $[\text{Fe}]$ é a concentração de ferro medida e $[\text{NPs}]$ a concentração de nanopartículas na amostra.

II.4.3. Hipertermia

Para determinar e quantificar a capacidade que as nanopartículas de óxido de ferro e os microgéis híbridos sintetizados possuíam de libertar calor quando expostos a um campo magnético externo foi utilizado o equipamento *NanoScale Biomagnetics, DM100 Series* (Figura II.1). Foi colocado num

frasco pequeno 1 ml de amostra a analisar, submetendo-o depois a um campo de 300 Gauss com uma frequência de 418,5 kHz durante 15 minutos.

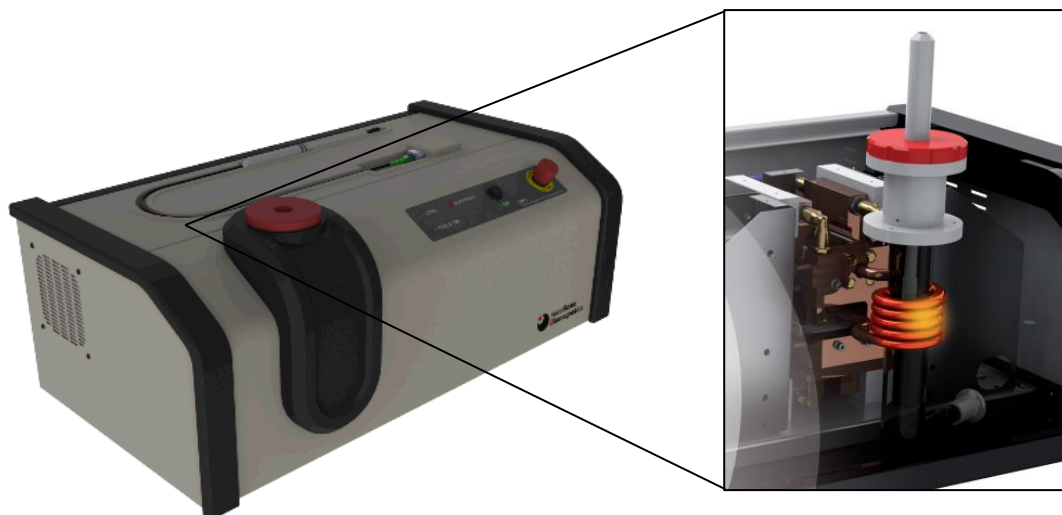


Figura II.1 - Componente do equipamento de hipertermia utilizado e respetivo pormenor do seu interior, onde se verifica o local onde é colocada a amostra (a branco) e a sua distância à bobine. Adaptado de [84]

II.4.4. Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

O DLS (*Dynamic Light Scattering*) é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de suspensões coloidais, nomeadamente para a medição dos seus tamanhos. Assim, com o intuito de medir o diâmetro hidrodinâmico dos microgéis produzidos, utilizou-se o *Horiba SZ-100 nanopartica series* e fez-se incidir um laser semiconductor com 532 nm utilizando uma célula descartável.

Assumindo que as partículas possuem um movimento Browniano aleatório, o raio hidrodinâmico das partículas (r_h) pode ser calculado a partir da equação de Stokes-Einstein (eq 7).

$$r_h = \frac{K_b \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde K_b é a constante de Boltzman, T a temperatura, η a viscosidade do dissolvente e D o coeficiente de difusão da luz.

Para caracterizar as propriedades de inchamento preparam-se dispersões de microgéis e microgéis híbridos com uma concentração de 0,01mg/ml. Foram feitas três medições para cada ponto, sendo testada uma gama de temperaturas dos 25°C aos 42°C.

II.4.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Recorrendo à técnica de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) as amostras foram analisadas de forma qualitativa, quanto à sua composição química. Através do espectro de transmissão (ou absorção) da radiação de infravermelho do material em estudo, é possível identificar os picos de frequência de vibração associados às ligações dos seus constituintes químicos. Para a análise dos pós dos microgéis, previamente liofilizados foi utilizado o espectrómetro *FTIR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation* com o sistema de ATR (*Attenuated Total Reflectance*).

Para a obtenção do espectro de transmissão da amostra, é inicialmente realizada uma aquisição de background, correspondente à linha de base, para desprezar qualquer composto exterior à amostra em estudo. Posteriormente a amostra é colocada no porta-substratos e a radiação que é transmitida através da mesma é recolhida e analisada.

II.4.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

A perda de massa de uma amostra quando submetida à temperatura devido à evaporação de solvente residual e à degradação dos seus constituintes por pirólise pode ser medida através da análise termogravimétrica (TGA- *Thermal Gravimetric Analysis*).

Neste trabalho a TGA foi utilizada para quantificar de forma indireta, a quantidade de nanopartículas de óxido de ferro que ficaram encapsuladas nos microgéis, bem como avaliar a estabilidade dos microgéis face à temperatura. Para tal, recorreu-se ao equipamento NETZSCH modelo STA 449F3, procedendo-se à medição entre os 20°C e 900°C, com uma velocidade de aquecimento igual a 10°C/min, sob atmosfera de azoto.

II.4.7. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

No SEM (Scanning Electron Microscope) um feixe de eletrões altamente energético interage com a amostra condutora, fazendo com que alguns dos seus eletrões saltem para níveis de energia mais altos. Quando estes regressam aos níveis de energia mais baixos, emitem energia sob a forma de raios-X que são captados por detetores. Assim, obtém-se imagens de alta resolução da estrutura superficial das amostras. [85]

Utilizou-se o equipamento *Zeiss DSM-962* para visualizar as amostras, no entanto, antes de serem colocadas no suporte de amostras e na câmara de observação, as amostras foram dispersas numa solução de etanol.

II.4.1. Análise da morfologia por TEM

A avaliação da morfologia das nanopartículas de magnetite foi obtida através da microscopia electrónica de transmissão (TEM, *Hitachi H-8100 II*, com emissão termiônica, LaB6, e resolução ponto a ponto de 2,7 Å, do Instituto Superior Técnico). Para se observar as amostras no TEM, fez-se uma diluição das amostras a analisar e uma pequena gota da suspensão foi colocada numa rede própria (rede de carbono), até a evaporação total do solvente.

II.4.2. Sistema Supercondutor de Interferência Quântica (SQUID)

A técnica de SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) foi utilizada para caracterizar a resposta dos microgéis quando expostos a um campo magnético, em função da temperatura. Utilizando um método de indução é difícil medir a voltagem induzida pela variação de fluxo magnético, assim, através desta técnica a amostra irá estar sujeita a uma frequência fixa. Tal em presença de um campo magnético externo gerará um fluxo que atravessará uma bobine captadora, originando uma força eletromotriz que será proporcional ao sinal magnético da amostra.

As ZFC (*Zero Field Cooled*) e FC (*Field Cooled*) foram realizadas entre temperaturas de 5 a 300K, aplicando-se um campo magnético $H=100$ Oe. Depois de medido o último ponto de temperatura, a amostra foi refrigerada até à temperatura inicial, mantendo um campo magnético de 100 Oe. Também se mediram os ciclos de histerese a 10 e 315 Kelvin.

III. Análise de Resultados

III.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas

A caracterização das nanopartículas de óxido de ferro, por difração de raios-x (DRX) e FTIR, foi efetuada num trabalho anterior [81].

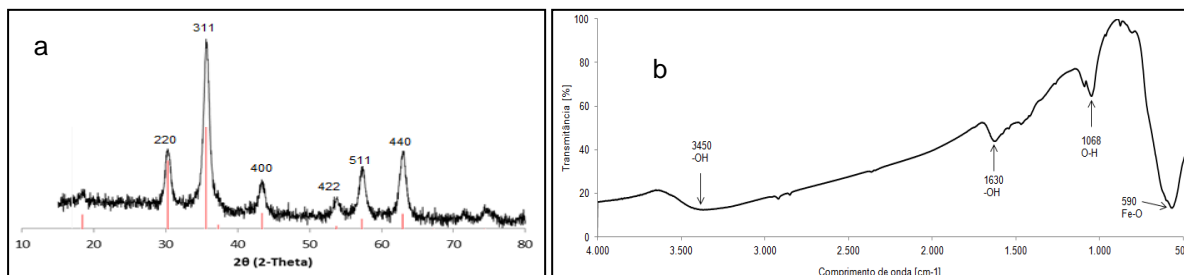


Figura III.1 – a) Difractograma de DRX das nanopartículas de Fe_3O_4 ; b) Espectro de FTIR das nanopartículas de Fe_3O_4 [81].

A Figura III.1a representa o difratograma de DRX das nanopartículas de Fe_3O_4 , onde se verifica a presença de bandas características da nanopartículas de óxido de ferro, para $2\theta = 30.2, 35.5, 43.1, 53.4, 57$ e 62.6 . As bandas mais estreitas representam a estrutura cristalina da amostra. Estas são consistentes com a folha padrão (código de referência: ICSD 98-001-2128), com uma estrutura em espinela inversa.

No espectro de FTIR da Figura III.1b observam-se as bandas a aproximadamente 580 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} . A banda a cerca de 580 cm^{-1} corresponde à vibração da ligação Fe–O, o que confirma a presença de um óxido de ferro. As bandas características dos grupos hidroxilo (-OH) surgem a aproximadamente 1600 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} , e uma banda a cerca de 1068 cm^{-1} que corresponde à vibração da ligação O–H da molécula da água [81].

A Figura III.2 representa uma imagem obtida por TEM das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas neste trabalho experimental. O diâmetro médio das NPs é de cerca de $9 \pm 2,2\text{ nm}$. Verifica-se uma grande agregação das nanopartículas, o que era esperado devido à ausência de tensoativo.

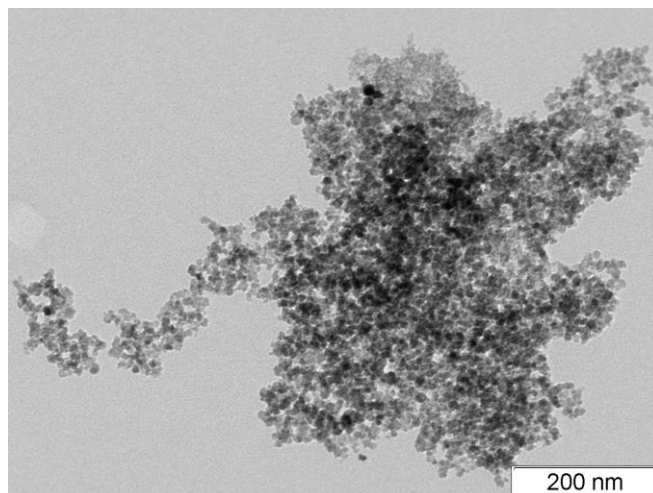


Figura III.2 – Imagem de Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento, produzidas por precipitação química.

III.2. Despolimerização do quitosano

A despolimerização do quitosano foi efetuada de forma a se obter o polímero com um peso molecular mais baixo, facilitando assim a reação com o NIPAAm.

Através da técnica de viscosimetria diluída, obteve-se uma viscosidade intrínseca de 0,496 dl/g o que corresponde a um peso molecular de 32,5 *kDa*.

III.3. Caraterização dos microgéis

A descrição dos resultados relativos à caracterização dos microgéis está dividida da seguinte forma:

- Estudo da estrutura (FTIR, TGA),
- Morfologia dos microgéis (SEM),
- Propriedades de inchamento (DLS),
- Propriedades magnéticas dos microgéis híbridos (SQUID)

III.3.1. Estrutura

(1) Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura III.3 estão presentes os espectros de FTIR do monómero NIPAAm e do microgel de PNIPAAm sintetizado.

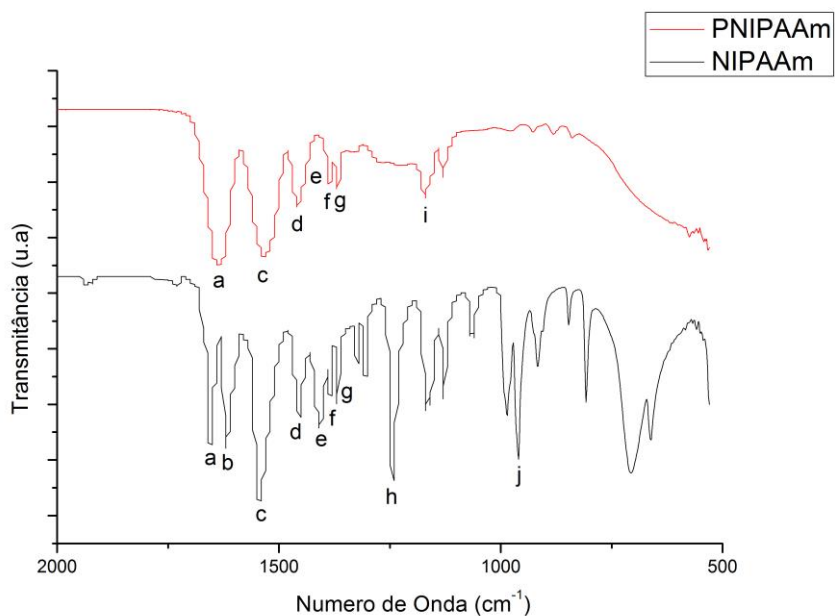


Figura III.3 - Espectro de FTIR de NIPAAm e microgel de PNIPAAm sintetizado.

O espectro do monómero possui as seguintes bandas: 1620 cm^{-1} ("b") a vibração da ligação (C=C), a 1456 cm^{-1} ("d") e 1410 cm^{-1} ("e") visualizam-se as bandas de deformação dos grupos (-CH₃) e (-CH₂-) do NIPAAm e a 1372 cm^{-1} ("g"), 1386 cm^{-1} ("f") e 1174 cm^{-1} ("i"), deteta-se o grupo isopropilo do NIPAAm. A 1657 cm^{-1} com a letra "a" está a banda do alongamento da ligação (C=O) da amida I, a 1545 cm^{-1} ("c") e 948 cm^{-1} ("j") o alongamento da ligação (-NH-) da amida II e 1242 cm^{-1} ("h") a vibração da amida III [86, 87].

No caso do PNIPAAm a banda correspondente à dupla ligação (C=C-), ("b"), observada no espectro do monómero, não está presente o que indica que ocorreu polimerização.

A Figura III.4 apresenta os espectros de FTIR do CS despolimerizado e dos microgéis de PNIPAAm-CS e híbridos sintetizados.

No espectro do CS são identificáveis quatro bandas: a 1150 cm^{-1} ("n") a ligação glicosídica (C-O-C), a 1080 cm^{-1} ("o") a vibração da ligação (C-O-C) da unidade glucosamina, a 1610 cm^{-1} ("k") o

alongamento da amida I, 1545 cm^{-1} ("c") vibração da amida II e a 1410 cm^{-1} ("e") a deformação de ($-\text{CH}_3$) e ($-\text{CH}_2$).^[88]

O espectro dos microgéis de PNIPAAm-CS e híbrido possuem todos os picos de vibração do PNIPAAm, exceto a vibração "i", a 1174 cm^{-1} . Nos mesmos espectros também são visíveis, duas vibrações representadas a 1150 cm^{-1} ("n") e a 1080 cm^{-1} ("o") características do quitosano.

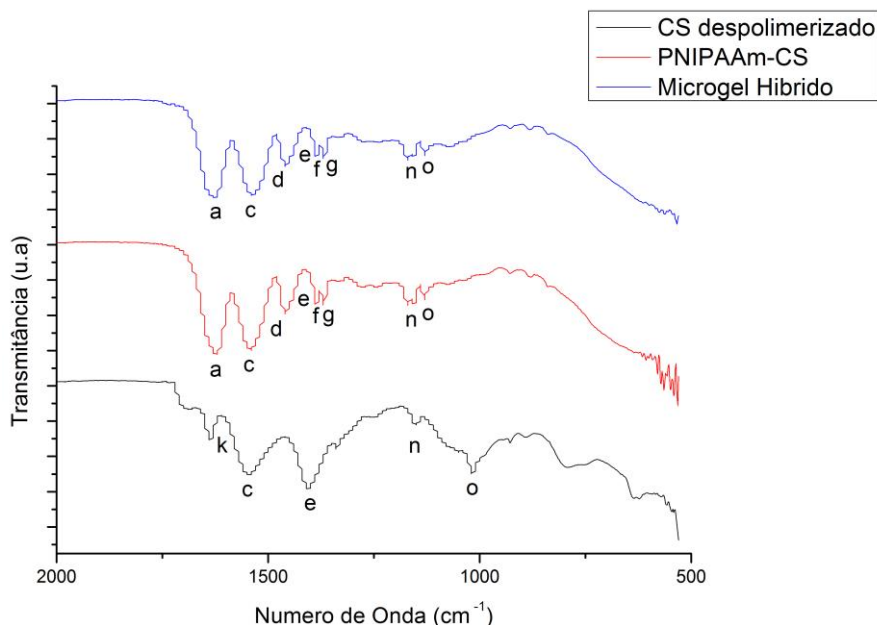


Figura III.4 - Espectro de FTIR do CS despolimerizado e dos microgéis de PNIPAAm-CS e Híbrido sintetizados.

(2) Propriedades térmicas. Determinação do conteúdo de NPs (TGA)

A análise termogravimétrica permite estudar a estabilidade térmica das amostras e quantificar de uma forma indireta a quantidade de nanopartículas de óxido de ferro que estão encapsuladas nos microgéis híbridos.

Na Figura III.5 (A, C) representam-se os termogramas relativos ao PNIPAAm, CS e aos microgéis de PNIPAM-CS 20% e PNIPAM-CS 40%.

A amostra de PNIPAAm apresenta uma primeira perda de massa nas gamas de temperatura entre os 25 e 100 °C o que se pode dever à evaporação de água que se encontra na superfície dos microgéis e também dentro dos mesmos, indicando um caráter higroscópico do polímero. A segunda perda de massa (aproximadamente 80% de perda) acontece perto dos 400°C devido a excisão aleatória das cadeias. Após atingir a temperatura de 900°C o resíduo que fica da decomposição de PNIPAM é de 2.5%.

No caso do Quitosano, este apresenta também duas etapas de decomposição. A primeira etapa é devido a evaporação da água que está ligada à superfície e adsorvida. A segunda etapa, que começa aos 200°C e continua até os 350°C deve-se à despolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do quitosano [89, 90], ocorrendo uma perda de massa de 45-50%. Neste caso o quitosano apresenta um resíduo final de 29.8%. Portanto, verifica-se que o quitosano é termicamente mais instável que o PNIPAAm, pois possui picos de decomposição a temperaturas mais baixas (Figura III.5).

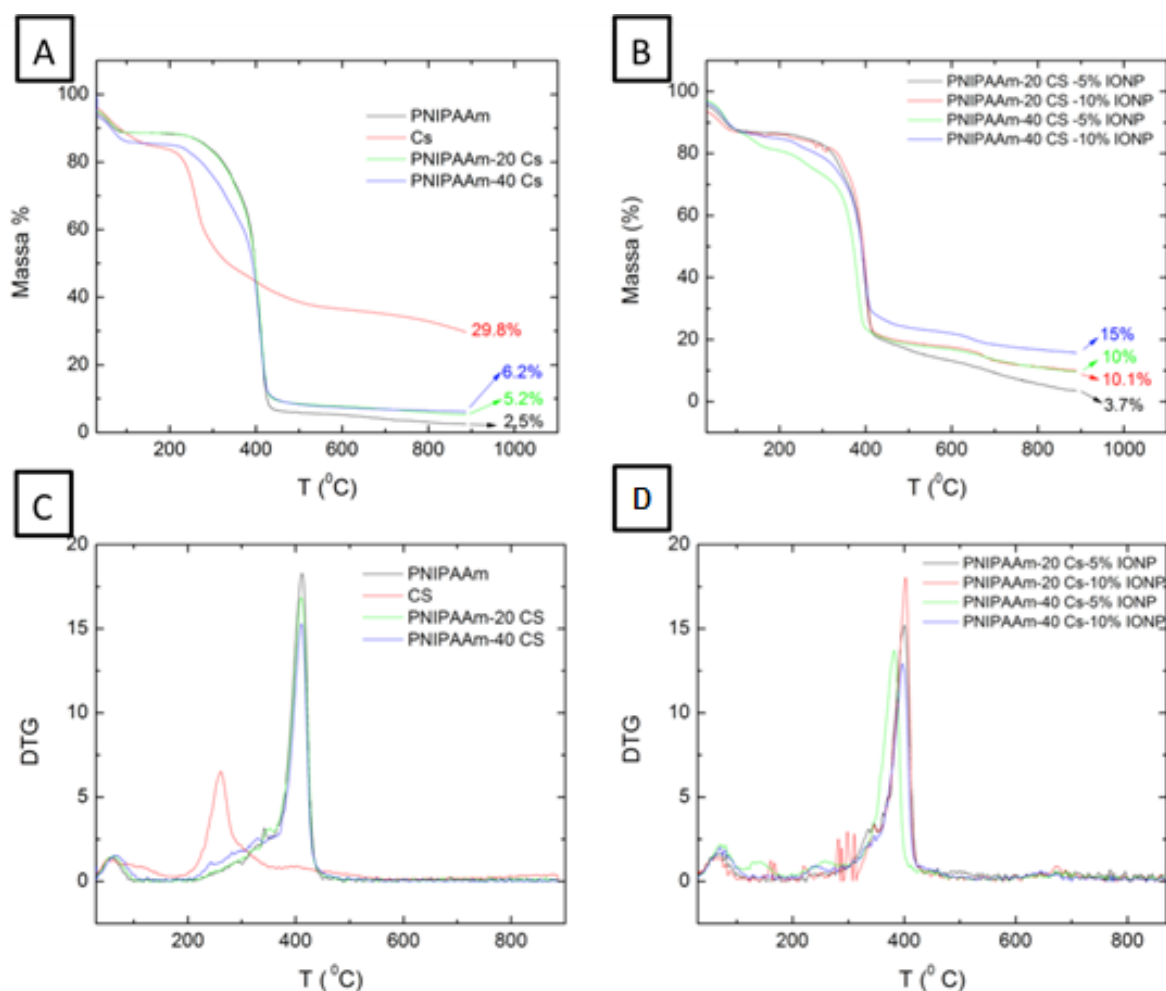


Figura III.5 - Termogramas dos microgéis sem NPs (A) e dos microgéis híbridos (B), e as respectivas derivadas (C e D).

Os termogramas dos microgéis de referência (PNIPAAm, CS, PNIPAAm-CS 20% e PNIPAAm-CS 40%) apresentam um comportamento semelhante ao PNIPAM, com a diferença de que na segunda etapa há uma perda de massa levemente maior em comparação ao PNIPAM; relativa ao quitosano. Verifica-se portanto que i) quanto maior a percentagem de CS que existe nos microgéis de referência, maior o seu resíduo final (Tabela III.1) e ii) a incorporação do quitosano não afeta significativamente a estabilidade térmica do PNIPAM. Além disso, o fato de não se distinguir diferentes etapas é indicativo da homogeneidade da amostra tal como já demonstraram outros autores [91].

Na Figura III.5 (B,D) apresentam-se os termogramas relativos aos microgéis híbridos (PNIPAM-Cs-20-5%FeNP, PNIPAM-Cs-20-10%FeNP, PNIPAM-Cs-40-5%FeNP, PNIPAM-Cs-40-10%FeNP) onde se pode observar que o comportamento térmico é similar ao dos microgéis de referência. Nas quatro amostras pode reconhecer-se as etapas comentadas anteriormente. No entanto, as diferenças mais importantes encontram-se no resíduo obtido, após o tratamento térmico. É possível determinar o conteúdo de nanopartículas encapsuladas nos microgéis híbridos através da diferença de resíduo obtido para cada microgel híbrido relativo a microgel de referência. Neste sentido a eficiência de encapsulação foi superior nos microgéis com maior conteúdo em quitosano. Excepcionalmente, verifica-se que o microgel PNIPAAm-CS 20% possui um resíduo final superior ao PNIPAAm-CS 20% 5% NPs. Este caso excepcional deve-se ao fato do microgel ter sido previamente decantado devido à existência de vários aglomerados. Tal procedimento poderá ter eliminado uma parte das nanopartículas presentes.

A partir da caracterização térmica dos microgéis, verificou-se que o quitosano tem uma estabilidade térmica menor que o PNIPAAm, contudo a incorporação de quitosano até uma percentagem de 40% não altera a estabilidade térmica do microgel. A incorporação das nanopartículas também não alterou as propriedades térmicas do microgel.

Tabela III.1 - Percentagens de resíduo final e de nanopartículas teórica e real nos microgéis, obtidas através dos resultados de TGA.

Amostra	% Final de Resíduo	% NPs Teórica	% NPs Real	% Encapsulamento
PNIPAAm	2,5	---	---	---
CS	29,8	---	---	---
PNIPAAm-CS 20%	5,2	---	---	---
PNIPAAm-CS 40%	6,2	---	---	---
PNIPAAm-CS 20% 5% NPs	3,7	5	- 1,5	---
PNIPAAm-CS 20% 10% NPs	10,1	10	4,9	49
PNIPAAm-CS 40% 5% NPs	10	5	3,8	38
PNIPAAm-CS 40%10% NPs	15	10	8,8	88

III.3.2. Morfologia

A microscopia eletrônica de varrimento fornece uma comprovação visual orientativa da forma, tamanho e distribuição de tamanhos dos microgéis.

Na Figura III.6 mostram-se as micrografias correspondentes as amostras PNIPAAm (imagens a e b), PNIPAAm-CS 20% (imagens c e d), PNIPAAm-CS 40% (imagens e e f), e PNIPAAm-CS 20% 10% NPs (imagens g e h). Através destas imagens, com recurso ao programa ImageJ®, foram medidos os

tamanhos das partículas dos microgéis sintetizados, estando na Tabela III.2 apresentados os diâmetros médios e os desvios-padrão obtidos.

O estado de agregação dos microgéis, presentes nas micrografias da Figura III.6, trata-se de um artifício que resulta da evaporação do solvente.

Como resultado geral pode observar-se que todas as amostras apresentam microgéis com uma morfologia esférica bem definida. O tamanho dos microgéis varia de 228 a 507 nm (tabela 5), o que está de acordo com a definição de microgel descrita na introdução.

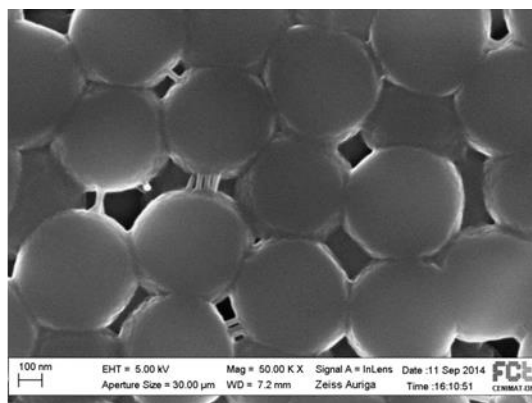
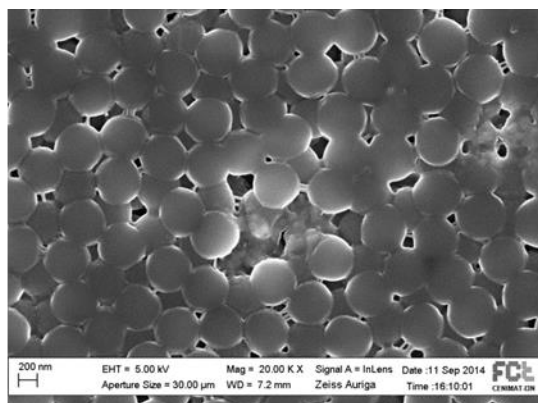
A amostra do microgel de PNIPAAm (Figura III.6 a e b) possui partículas com um diâmetro médio de 507 nm. Os microgéis compostos por PNIPAAm-CS 20% (Figura III.6 c e d) e PNIPAAm-CS 40% (Figura III.6 e e f) apresentam partículas com 346 e 228 nm, respetivamente. Verificando-se que com o aumento do CS na composição do microgel, o tamanho das partículas diminui. Contudo a presença do quitosano não influencia a morfologia das partículas. O desvio padrão (Tabela III.2) também diminui com o aumento do conteúdo em CS.

O microgel híbrido PNIPAAm-CS 20% 10% NPs (Figura III.6 g e h) possui partículas com 228 nm de diâmetro. Este valor comparando com o obtido no microgel de referência (Figura III.6 c e d) é menor. Neste caso as nanopartículas incorporadas também não alteram a morfologia esférica do microgel. No entanto, o microgel híbrido apresenta partículas com maior dispersão de tamanho, tendo em conta o desvio padrão (Tabela III.2) obtido face aos restantes microgéis.

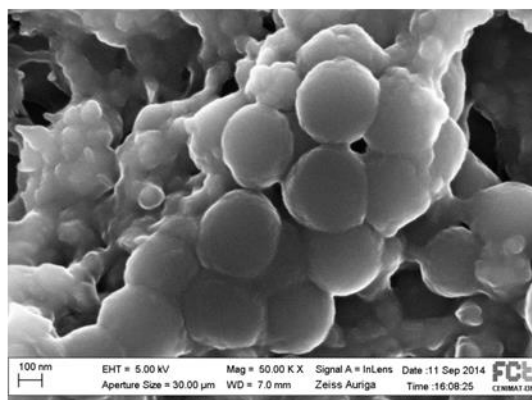
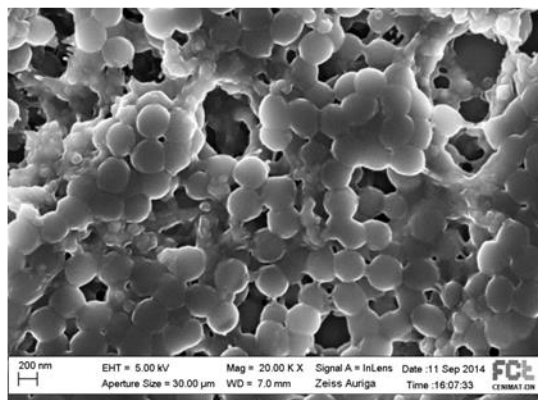
Tabela III.2 - Tamanho médio e Desvio Padrão das partículas das amostras dos microgéis de PNIPAAm, PNIPAAm-CS 20%, PNIPAAm-CS 40% e PNIPAAm-CS 20% 10% NPs.

Amostra	Tamanho médio e Desvio Padrão dos microgéis (nm)
PNIPAAm	507
PNIPAAm-CS 20%	346 ± 19
PNIPAAm-CS 40%	228 ± 3
PNIPAAm-CS 20% 10% NPs	228 ± 25

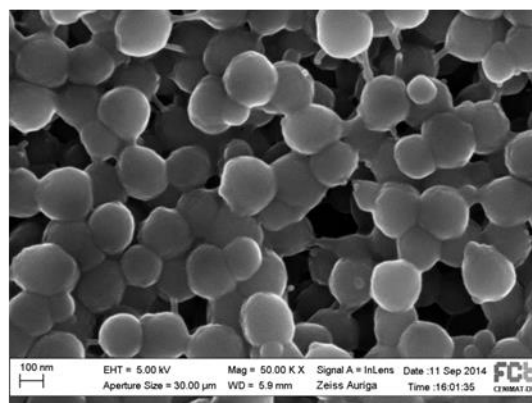
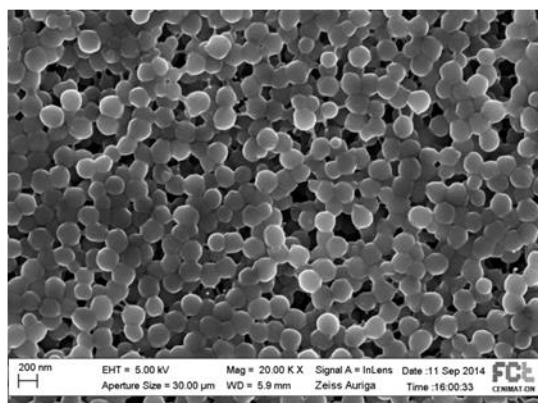
PNIPAAm



PNIPAAm-Cs20%



PNIPAAm-Cs40%



PNIPAAm-Cs20%-10%NPs

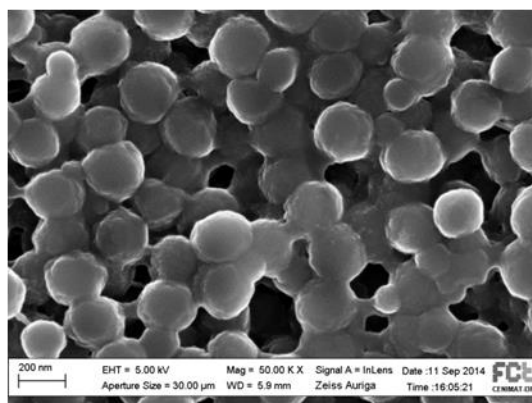
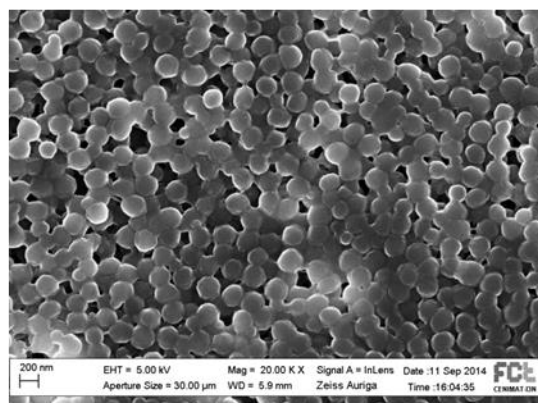


Figura III.6 - Imagens de SEM obtidas de amostras dos microgéis sintetizados: PNIPAAm (a,b), PNIPAAm-CS 20% (c,d), PNIPAAm-CS 40% (e,f), PNIPAAm-CS 20% 10% NPs (g,h). À esquerda encontram-se as imagens com uma escala de 200 nm e à direita com 100 nm.

III.3.3. Propriedades de Inchamento

O estudo da termossensibilidade e das propriedades de inchamento dos microgéis foi realizado através da técnica da dispersão de luz dinâmica.

Na Figura III.7 (A) e (B) estão representados os gráficos relativos à evolução com a temperatura do diâmetro hidrodinâmico e do inchamento relativo $[(d/d_0)^3]$, respectivamente, para os microgéis de PNIPAAm, PNIPAAm-CS e PNIPAAm-CS 20% 10% NPs (Híbrido).

Em ambos os gráficos observa-se que as amostras apresentam um comportamento do tipo LCST, uma vez que com o aumento da temperatura o seu diâmetro hidrodinâmico diminui.

A temperatura de transição (LCST) do PNIPAAm, em solução aquosa, ocorre nos 32°C [19]. Assim, como esperado a amostra de PNIPAAm apresenta uma LCST nos 32-33°C. No caso dos microgéis com quitosano e do microgel híbrido, estes não sofrem alteração nenhuma na LCST, sendo esta próxima aos 32-33°C.

Na figura III.7 A observa-se que a temperaturas abaixo da LCST (inferior a 32°C), onde os microgéis encontram-se num estado inchado, estes apresentam um diâmetro hidrodinâmico menor à medida que aumenta o conteúdo em CS. Assim a amostra de PNIPAM tem um diâmetro hidrodinâmico perto dos 700 nm, enquanto o microgel com 20% e 40% de CS tem um diâmetro hidrodinâmico de 500 e 300 nm respectivamente. Este efeito observa-se também para o microgel híbrido PNIPAM-CS 20% 10% IONPs. Esta amostra apresenta, no estado inchado, um diâmetro hidrodinâmico próximo aos 400nm, 100nm menor que o microgel de referência.

O efeito da adição de CS e da incorporação das IONPs nota-se também, e de maneira mas clara, na capacidade de inchamento dos microgéis. Na figura III.7 B observa-se que a adição de 20% de CS não altera a capacidade de inchamento do microgel enquanto a adição de 40% de CS limita o inchamento até 50%. Efeito similar é observado para a amostra PNIPAM-CS 20% 10% IONPs em que a adição das IONPs origina perda de capacidade de inchamento de 50%, em comparação ao sistema sem IONPs.

Verifica-se que as amostras dos microgéis que possuem CS, têm um ligeiro aumento de diâmetro acima da LCST, o que poderá dever-se à perda de homogeneidade dos microgéis, quando ocorre o colapso.

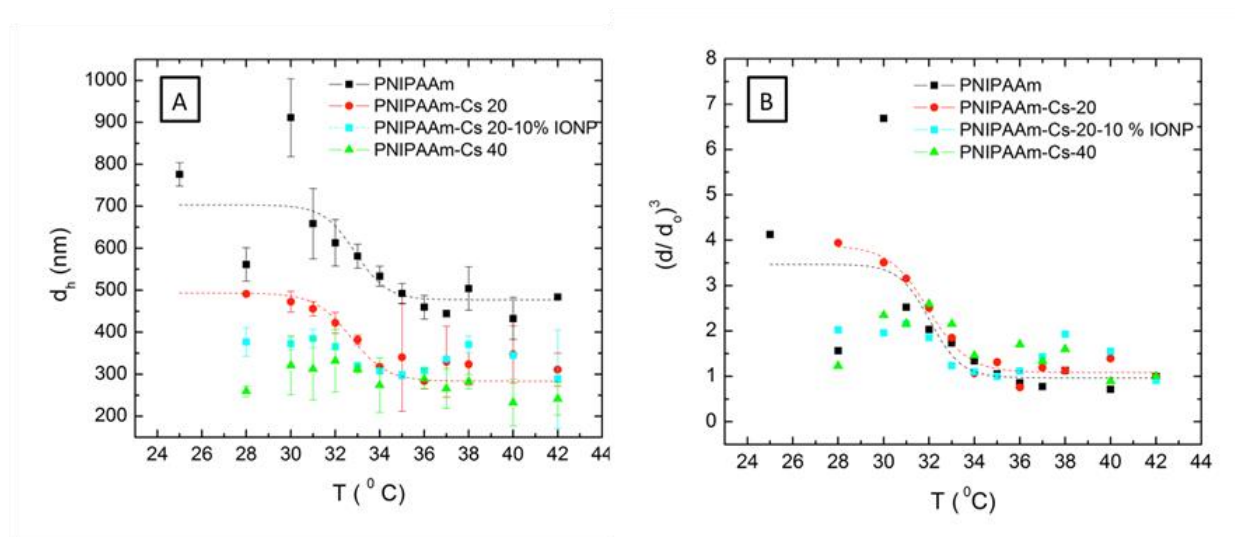


Figura III.7 - **(A)** Diâmetro Hidrodinâmico e **(B)** Inchamento relativo das partículas dos microgéis de: PNIPAAm (quadrados pretos), PNIPAAm-CS 20% (circunferências), PNIPAAm-CS 40% (triângulos) e híbrido (quadrados azuis).

III.3.4. Propriedades magnéticas (SQUID)

A magnetização dependente da temperatura (Figura III.8) das nanopartículas de óxido de ferro mostra um pico à volta dos 155 K, o que corresponde à temperatura de bloqueio T_B determinada a partir do cruzamento entre as curvas de *zero-field-cooled* (ZFC) e *field-cooled* (FC). Analisando as curvas respetivas às amostras do microgel híbrido verifica-se que existe uma diminuição da temperatura do bloqueio, situando-se entre os 50 e 100K.

As curvas de histerese a 315K das nanopartículas e dos microgéis híbridos estão representadas na Figura III.9. As nanopartículas sem qualquer revestimento atingem um valor de magnetização de saturação de 67 emu/g. Quando as nanopartículas são incorporadas no microgel a magnetização de saturação diminui drasticamente. No caso do microgel com 20% de quitosano e 10% de NPs a magnetização de saturação é cerca de 3 emu/g, enquanto para o microgel com 40% de quitosano e 10% de NPs a magnetização de saturação é cerca de 6 emu/g. Este resultado está relacionado com a taxa de encapsulação de NPs ser superior no microgel com 40% de CS, comparando com a mesma taxa para o microgel com 20% de CS, como comprovado pelos dados obtidos por TGA (ver tabela III.1)

Em todos os casos verifica-se que as nanopartículas apresentam um comportamento superparamagnético acima da temperatura de bloqueio, confirmado pela ausência de campo coercivo e magnetização remanescente a 315K (Figura III.8).

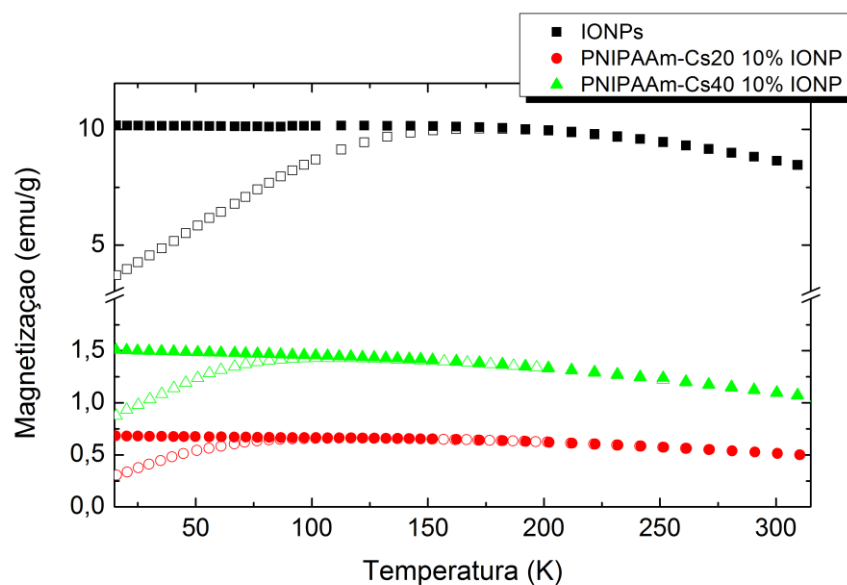


Figura III.8 – Representação das curvas de ZFC (figuras sem preenchimento) e FC (figuras com preenchimento) para a amostra de NPs e para os microgéis híbridos com 10% de NPs.

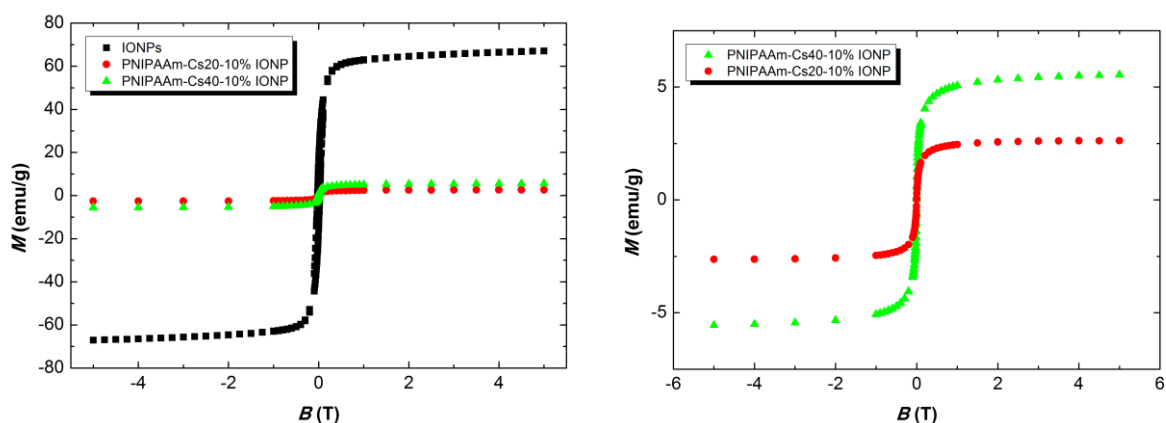


Figura III.9 – Magnetização em função do campo aplicado para a amostra de NPs e para os microgéis híbridos com 10% de NPs.

III.4. Hipertermia magnética

Realizaram-se testes de hipertermia magnética às amostras de nanopartículas de óxido de ferro, PNIPAAm-CS 20% com 5% e 10% de NPs e PNIPAAm-CS 40% com 10% NPs.

Na tabela 4 estão os resultados da análise hipotérmica das amostras. Verifica-se que a amostra de NPs apresenta um ILP inferior ao esperado, comparativamente com a literatura [92].

Tendo em conta o valor de ILP (Tabela III.3) dos microgéis com igual conteúdo em CS, verifica-se que as amostras PNIPAAm-CS 20%, libertam mais calor quando a concentração teórica de nanopartículas é superior, ou seja, PNIPAAm-CS 20% 10%NPs tem um ILP superior.

Tabela III.3 – Valores de ILP das nanopartículas e dos microgéis de PNIPAAm-CS-NPs sintetizados.

Amostra	% NPs Teórica	% NPs Real	% Encapsulamento	$\left(\frac{\Delta T}{\Delta t}\right)_{m\acute{a}x} \cdot (^{\circ}\text{C/s})$	ILP (nH. m ² /Kg)
Nanopartículas	1	1	--	0,003	0,061
PNIPAAm-CS 20% 5%NPs	5	--*	--	0,001	0,322
PNIPAAm-CS 20% 10%NPs	10	4,9	49	0,004	3,251
PNIPAAm-CS 40% 10%NPs	10	8,8	88	0,002	0,7191

* Após a síntese do microgel, uma parte das NPs precipitou, possivelmente com algum quitosano, o que pode justificar a menor % de resíduo final da amostra, comparando com a amostra de referência PNIPAAm-CS 20%. Por isso, foi usada a concentração teórica de nanopartículas para calcular o valor do ILP.

Comparando as amostras com igual conteúdo em NPs, pela Figura III.10 e pelos valores de ILP, verifica-se que a amostra de PNIPAAm-CS 40% 10%NPs aquece menos do que PNIPAAm-CS 20% 10%NPs.

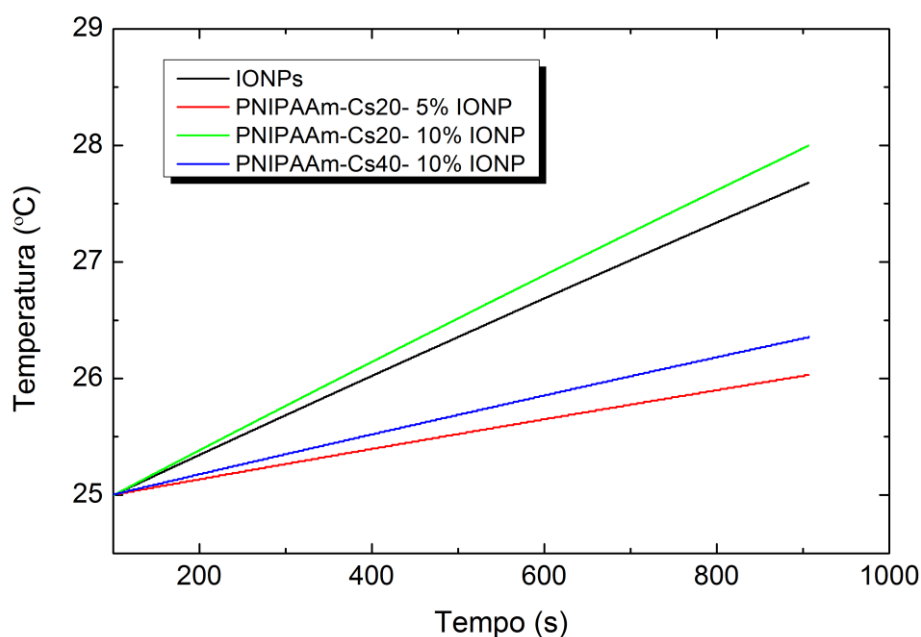


Figura III.10 - Calor originado pelas Amostras: PNIPAAm-CS 20% com 5% e 10 % NPs e PNIPAAm-CS 40% com 10 % NPs.

IV. Discussão de Resultados

A síntese dos microgéis neste trabalho foi realizada recorrendo a técnica de polimerização por emulsão sem tensioativo, devido ao fato desta técnica permitir a obtenção de microgéis de uma dispersão de partículas coloidais com uma estreita distribuição de tamanhos.

Um dos objetivos deste trabalho experimental passou pela preparação e caracterização de microgéis de PNIPAAm, PNIPAAm com quitosano e híbridos. Para tal, realizaram-se varias reações com diferentes quantidades de quitosano e nanopartículas, mantendo os restantes reagentes constantes. Verificou-se que apenas acima de um conteúdo de 20% de quitosano foi possível obter uma dispersão de microgéis estável. Abaixo desta percentagem verificava-se a formação de um precipitado. Assim, e com base em estudos existentes na literatura, demonstra-se que o quitosano atua como tensioativo na formação do microgel [91].

O propósito de utilizar o quitosano neste sistema de microgéis surgiu do fato de que quando se procedeu à síntese do microgel de PNIPAAm com as NPs, utilizando a técnica de polimerização por emulsão sem tensioativo, estas terem precipitado completamente o que demonstra que não foram encapsuladas no microgel. Assim, dada a vasta utilização do quitosano como tensioativo [93] para as nanopartículas magnéticas, este polímero foi utilizado para permitir o encapsulamento das NPs no microgel, sem a necessidade de efetuar-se tratamentos prévios às NPs ou de se alterar a técnica de produção do microgel. Assim, obtinha-se através de uma técnica simples, microgéis híbridos com uma baixa dispersão de tamanhos.

A encapsulação das nanopartículas no microgel foi comprovada, de forma indireta através de medidas termogravimétricas e mediante a observação direta das propriedades dos microgéis híbridos.

A caracterização dos microgéis de PNIPAAm-CS mostra que o quitosano não altera a morfologia esférica dos microgéis, comparativamente com o microgel de PNIPAAm. Contudo, a presença do quitosano no microgel diminuiu o tamanho das partículas coloidais, além de alterar a capacidade de inchamento (quando acima de 40%), do mesmo o que demonstra o seu papel como tensioativo. Além disso, observa-se tanto por DLS como por SEM, que o aumento da percentagem de CS nos microgéis diminui o tamanho médio das partículas formadas. Tal, estará relacionado com as interações electroestáticas que as cargas positivas do CS estabelecem com as cargas negativas do PNIPAAm, estabilizando os microgéis formados.

No caso do microgel híbrido, a introdução de NPs também diminui o tamanho da partícula e a sua capacidade de inchamento, sem alterar a morfologia esférica do microgel. Isto poderá ser explicado pelas interações que estas estabelecem com as cadeias do polímero. Neste caso as nanopartículas podem atuar como pontos de reticulação no microgel, diminuindo a mobilidade das cadeias que formam as pontes de hidrogénio responsáveis pela alteração de volume. Esta hipótese coincide com

os resultados de DLS em que se observa que os microgéis híbridos têm uma menor capacidade de inchamento.

É importante destacar que a LCST não é alterada em nenhum dos casos, o que indica que os grupos funcionais responsáveis pela transição de volume do PNIPAAm não são modificados. Estes resultados podem ser indicativos de que a interação que ocorre entre o PNIPAAm, o quitosano e as nanopartículas é uma interação física. Esta suposição coincide com os resultados obtidos por DLS, em que a temperaturas mais elevadas (acima da LCST), quando o microgel está colapsado, existe uma instabilidade do mesmo, resultando numa maior dispersão de tamanhos.

Após comprovar a estrutura do microgel híbrido, realizou-se a caracterização magnética do mesmo. Verificou-se que a encapsulação das nanopartículas no microgel afeta fortemente as suas propriedades magnéticas. Embora as nanopartículas não mudem o seu comportamento superparamagnético, acima da temperatura de bloqueio, a magnetização de saturação diminui num fator de aproximadamente dez vezes.

Apesar de as propriedades de inchamento e magnéticas não serem as esperadas, foi testada a capacidade dos microgéis híbridos gerarem calor aquando da aplicação de um campo magnético externo. Verificou-se que as nanopartículas sozinhas apresentam um valor de ILP muito baixo, quando comparado com os valores de referência da literatura [92]. Este valor pode ser justificado pelo fato das nanopartículas produzidas não possuírem qualquer agente estabilizante, o que leva à sua agregação. Quando as mesmas são incorporadas no microgel, o quitosano tem um papel estabilizante, evitando a agregação das NPs. Assim, os valores de ILP são superiores para os microgéis híbridos, quando comparados com as nanopartículas sozinhas.

Comparando os valores de ILP, nos microgéis com diferentes percentagens de CS e igual percentagem de NPs, verifica-se que o ILP é menor no microgel com o maior conteúdo de quitosano. Isto pode dever-se ao maior aprisionamento das NPs na rede polimérica, impedindo a sua movimentação e consequentemente, há uma diminuição no calor gerado. Outra hipótese é que a rede polimérica seja mais densa pois para um tamanho de partícula menor, o conteúdo de sólidos é maior, o que levará a uma maior absorção de calor, impedindo que este se dissipe para o meio.

Estes resultados demonstram que o quitosano não só promove o encapsulamento das NPs no microgel, como também previne a sua agregação, aumentando o tempo de aplicabilidade do microgel híbrido.

V. Conclusão e Perspetivas Futuras

As principais conclusões deste trabalho são:

- Foi possível sintetizar microgéis de PNIPAAm-CS utilizando o método de polimerização por emulsão na ausência de um tensioativo;
- Foi identificada uma percentagem de quitosano, a partir do qual este atua como tensioativo e permite a formação do microgel;
- Através da eficiência de encapsulação, obtida por TGA, verifica-se que o quitosano permite aumentar a percentagem de encapsulação das NPs;
- A caracterização dos microgéis, por SEM e DLS, revelou que as proporções de CS e NPs no microgel afetam a capacidade de inchamento e o tamanho dos mesmos;
- Os resultados dos ensaios de hipertermia revelaram que os microgéis híbridos termossensíveis possuíam capacidade de gerar calor.

Portanto este trabalho permitiu o desenvolvimento de um método de preparação de microgéis híbridos, com resposta ao campo magnético aplicado e à temperatura. A potencialidade da aplicação dos microgéis desenvolvidos em hipertermia magnética foi estudada.

Contudo, os dados obtidos na caracterização dos microgéis, nomeadamente na capacidade de inchamento e nas propriedades magnéticas, não foram os esperados. Assim sendo, as perspetivas futuras deste trabalho passam: (i) pela otimização do sistema de forma a melhorar as suas propriedades, especialmente as propriedades de inchamento e magnéticas. Para atingir este fim seria necessário procurar as proporções ideais dos componentes do microgel. Uma possibilidade passaria por adicionar um co-monomero (por exemplo, ácido acrílico), de forma a mudar a LCST para temperaturas próximas da temperatura corporal. Com o mesmo propósito, outra possibilidade seria a diminuição do grau de reticulação do microgel. (ii) Pelo estudo da possibilidade de utilização dos sistemas desenvolvidos na libertação controlada de fármacos.

VI. Bibliografia

- [1] He W, Benson R. Polymeric Biomaterials In: Kayvon Modjarad SE, editor. Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices. Elsevier 2014. p. 55-69.
- [2] Ratner B, Bryant S. Biomaterials: where we have been and where we are going. Annual Review Biomedical Engineering 2004;6:41-75.
- [3] Kausar N, Chowdhry B, Snowden M. Microgels from Smart polymers In: Igor Galaev BM, editor. Smart Polymers: Applications in Biotechnology and Biomedicine. second ed 2008. p. 138- 71.
- [4] Baker W. Microgel, a New Macromolecule. Relation to Sol and Gel as Structural Elements of Synthetic Rubber. Chemistry and Technology 1949;22:935-55.
- [5] Murray M, Snowden M. The preparation, characterisation and applications of colloidal microgels. In: Science AiCaI, editor. 1995. p. 73-91.
- [6] Das M, Zhang H, Kumacheva E. MICROGELS: Old Materials with New Applications. Annual Review of Materials Research 2006;36:117-42.
- [7] Smeets N, Hoare T. Designing Responsive Microgels for Drug Delivery Applications. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry 2013;51:3027-43.
- [8] Otake K, Inomata H, Konno M, Saito S. Thermal analysis of the volume phase transition with N-isopropylacrylamide gels. Macromolecules 1990;23:283-9.
- [9] Thorne J, Vine G, Snowden M. Microgel applications and commercial considerations. Colloid and Polymer Science 2011;289:625-46.
- [10] Echeverria C. Desarrollo De Microgeles Termosensibles Híbridos: De la estructura a las potenciales aplicaciones. : Universidad del País Vasco 2011.
- [11] Echeverria C, López D, Mijangos C. UCST Responsive Microgels of Poly(acrylamide-acrylic acid) Copolymers: Structure and Viscoelastic Properties. Macromolecules 2009;42:9118-23.
- [12] Lee HT, Lee DS. Thermoresponsive phase transitions of PLA-block-PEO-block-PLA triblock stereo-copolymers in aqueous solution. Macromolecules research 2002;10:359-64.
- [13] Idziak I, Avoce D, Lessard D, Gravel D, Zhu X. Thermosensitivity of Aqueous Solutions of Poly(N,N-diethylacrylamide). Macromolecules 1999;32:1260-3.
- [14] Van Durme K, Verbrugghe S, Du Prez F, Van Mele B. Influence of poly(ethylene oxide) grafts on kinetics of LCST behavior in Aqueous poly(N- vinylcaprolactam) solutions and networks studied by modulated temperature DSC. Macromolecules 2004;37:1054-61.
- [15] Lee MS, kim J-C. Effects of Surfactants on Phase Transition of Poly(N-isopropylacrylamide) and Poly(N-isopropylacrylamide-co-dimethylaminoethylmethacrylate). Journal of Dispersion Science and Technology 2012;33:272-7.
- [16] Barroso T, Viveiros R, Coelho M, Casimiro T, Rego A, Aguiar-Ricardo A. Influence of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N,N'-diethyl acrylamide) coatings on polysulfone/polyacrylonitrile-based membranes for protein separation. Polymers for Advanced technologies 2012;23:1381-93.
- [17] Temtem M, Barroso T, Casimiro T, Mano J, Aguiar-Ricardo A. Dual stimuli responsive poly(N-isopropylacrylamide) coated chitosan scaffolds for controlled release prepared from a non residue technology. The Journal of Supercritical Fluids 2012;66:398-404.

- [18] Pelton R, Chibante P. Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces* 1986;20:247-56.
- [19] Heskins M, Guillet J. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* 1968;2:1441-55.
- [20] Southall N, Dill K, Tony H. A view of the hydrophobic effect. *The Journal of Physical Chemistry B* 2002;106:521-33.
- [21] Dimitrov I, Trzebicka B, Müllerc A, Dworak A, Tsvetanov C. Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities. *Progress in Polymer Science* 2007;32:1275-343.
- [22] Bouillot P, Vincent J. A comparison of the swelling behaviour of copolymer and interpenetrating network microgel particles. *Colloid and Polymer Science* 2000;278:74-9.
- [23] Saunders BR. On the Structure of Poly(N-isopropylacrylamide) Microgel Particles. *Langmuir* 2004;20:3925-32.
- [24] Senff H, Richtering W. Temperature sensitive microgel suspensions: Colloidal phase behavior and rheology of soft spheres. *The Journal of Chemical Pshysics* 1999;111:1705-11.
- [25] Richtering W, Senff H. Influence of cross-link density on rheological properties of temperature-sensitive microgel suspensions. *Colloid and Polymer Science* 2000;278:830-40.
- [26] Nolan C, Gelbaum L, Lyon A. H NMR Investigation of Thermally Triggered Insulin Release from Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels. *Biomacromolecules* 2006;7:2918-22.
- [27] Saunders J, Tong T, Maitre C, Freemont T, Saunders B. A study of pH-responsive microgel dispersions: from fluid-to-gel transitions to mechanical property restoration for load-bearing tissue. *Soft Matter* 2007;3:486-94.
- [28] Dalmont H, Pinprayoon O, Saunders B. Study of pH-Responsive Microgels Containing Methacrylic Acid: Effects of Particle Composition and Added Calcium. *Langmuir* 2008;24:2834-40.
- [29] Jones C, Lyon A. Photothermal Patterning of Microgel/Gold Nanoparticle Composite Colloidal Crystals. *Journal of the American Chemical Society* 2003;125:460-5.
- [30] Hoare T, Pelton R. Engineering Glucose Swelling Responses in Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Microgels. *Macromolecules* 2007;40:670-8.
- [31] Asua J. Emulsion polymerization: From fundamental mechanisms to process developments. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2004;42:1025-41.
- [32] Estevinho B, Rocha F, Santos L, Alves A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science and Technology* 2013;31:138-55.
- [33] Helgeson M, Chapin S, Doyle P. Hydrogel microparticles from lithographic processes: Novel materials for fundamental and applied colloid science. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2011;16:106-17.
- [34] Ariga K, Lvov Y, Qingmin J, Hill J. Layer-by-Layer self-assembled shells for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011;63:762-71.
- [35] Dardelle G, Normand V. Method for preparing microcapsules by coacervation. USA2007.
- [36] Zhang H, Tumarkin E, Sullan R, Walker G, Kumacheva E. Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers. *Macromolecular Rapid Communications* 2007;28:527-38.
- [37] Temtem M, Casimiro T, Mano J, Aguiar-Ricardo A. Green synthesis of a temperature sensitive hydrogel. *Green Chemistry* 2007;9:75-9.

- [38] Becker P. Emulsions: Theory and Practice. In: Co. RP, editor. 2nd ed. Nova Iorque 1965.
- [39] Chern C-S. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. *Progress in Polymer Science* 2006;31:443-86.
- [40] Anderson C, Daniels E. Emulsion Polymerisation and Latex Applications. *Rapra Review Report* 2003;14:3-12.
- [41] Klaus T. Latex Particles. In: Caruso F, editor. *Colloids and Colloid Assemblies- Synthesis, Modification, Organization and Utilization of Colloid Particles* Alemanha 2004. p. 1-45.
- [42] Goodwin J, Hearn J, Ho C-L, Ottewill R. Preparation and Characterisation of Polymer latices formed in the Absence of Surface active agents. *Polymer Journal* 1973;5:347-62.
- [43] Nayak S, Lyon A. Soft Nanotechnology with Soft Nanoparticles. *Soft Nanotechnology* 2005;44.
- [44] Karg M, Hellweg T. Smart inorganic/organic hybrid microgels: Synthesis and characterisation. *Journal of Materials Chemistry* 2009;19:8714-27.
- [45] Xulu P, Filipcsei G, Zrínyi M. Preparation and Responsive Properties of Magnetically Soft Poly(N-isopropylacrylamide) Gels *Macromolecules* 2000;33:1716-9.
- [46] Namdeo M, Saxena S, Tankhiwale R, Bajpai M, Mohan M, Bajpai S. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2008;8:3247-71.
- [47] Sánchez-Iglesias A, Grzelczak M, Rodríguez-González B, Guardia-Girós P, Pastoriza-Santos I, Pérez-Juste J, *et al.* Synthesis of Multifunctional Composite Microgels via In Situ Ni Growth on pNIPAM-Coated Au Nanoparticles. *ACS Nano* 2009;3:3184-90.
- [48] Nash M, Yager P, Hoffman A, Stayton P. Mixed Stimuli-Responsive Magnetic and Gold Nanoparticle System for Rapid Purification, Enrichment, and Detection of Biomarkers. *Bioconjugate Chemistry* 2010;21:2197-204.
- [49] Tamer U, Gündoğdu Y, Boyacı I, Pekmez K. Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection. *Journal of Nanoparticle Research* 2009;12:1187-96.
- [50] Ali SW, Rajendran S, Joshi M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers* 2011;83:438-46.
- [51] Liu Y-Y, Liu X-Y, Yang J-M, Lin D-L, Chen X, Zha L-S. Investigation of Ag nanoparticles loading temperature responsive hybrid microgels and their temperature controlled catalytic activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2012;393:105-10.
- [52] Kalu E, Daniel M, Bockstaller M. Synthesis, Characterization, Electrocatalytic and Catalytic Activity of Thermally Generated Polymer-Stabilized Metal Nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science* 2012;7:5297-313.
- [53] Johannsen M, Thiesen B, Gneveckow U, Taymoorian K, Waldöfner N, Scholz R, *et al.* Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer. *Prostate* 2006;66:97-104.
- [54] Scheich J, Sibret P, Danhier F, Ucakar B, Laurent S, Muller R, *et al.* Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Int J Pharm* 2013;447:94-101.
- [55] Ziv-Polat O, Skaat H, Shahar A, Margel S. Novel magnetic fibrin hydrogel scaffolds containing thrombin and growth factors conjugated iron oxide nanoparticles for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* 2012;7:1259-74.

- [56] Korotych O, Samchenko Y, Sukhodub L, Ulberg Z. Thermosensitive Hydrogels and Microgels Based on N-isopropylacrylamide and Acrylamide with Incorporated Magnetite. *Proceedings of the International Conference Nanomaterials: Applications and Properties* 2013;2.
- [57] Zhang J, Xu S, Kumacheva E. Polymer Microgels: Reactors for Semiconductor, Metal, and Magnetic Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 2003;126:7908-14.
- [58] Contreras-Cáceres R, Abalde-Cela S, Guardia-Girós P, Fernández-Barbero A, Pérez-Juste J, Alvarez-Puebla R, *et al.* Multifunctional Microgel Magnetic/Optical Traps for SERS Ultradetection. *American Chemical Society* 2011;27:4520-5.
- [59] Guo J, Yang W, Deng Y, Wang C, Shoukuan F. Organic-Dye-Coupled Magnetic Nanoparticles Encaged Inside Thermoresponsive PNIPAM Microcapsules. *Small* 2005;1:735-43.
- [60] Pich A, Bhattacharya S, Ghosh A, Adle H. Composite magnetic particles: 2. Encapsulation of iron oxide by surfactant-free emulsion polymerization. *Polymer* 2005;46:4596-603.
- [61] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003;55:329-47.
- [62] Medeiros S, Santos A, Fessi H, Elaissairi A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2011;403:139-61.
- [63] Chichel A, Skowronek J, Kubaszewska M, Kanikowski M. Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* 2007;12:267-75.
- [64] Soares P, Ferreira I, Igreja R, Novo C, Borges J. Application of Hyperthermia for Cancer Treatment: Recent Patents Review. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 2012;7:64-73.
- [65] Gilchrist R, Medal R, Shorey W, Hanselman R, Parrot J, Taylor C. Selective inductive heating of lymph nodes. *Annual Surgery* 1957;146(4):596–606.
- [66] Cherukuri P, Glazer E, Curley S. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews* 2010;62:339-45.
- [67] Boyer C, Whittaker M, Bulmus V, Liu J, Davis T. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Materials* 2010;2:23-30.
- [68] Laurent S, Dutz S, Hafeli U, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in colloid and interface science* 2011;166:8-23.
- [69] Kumar C, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:789-808.
- [70] Dickson J, Calderwood S. Temperature range and selective sensitivity of tumors to hyperthermia: a critical review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;335:180-205.
- [71] Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst Q. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2009;321:1509-13.
- [72] Administration USFaD. Acrylamide. 2014.
- [73] Johannsen M, Thiesen B, Jordan A, Taymoorian K, Gneveckow U, Waldöfner N, *et al.* Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *The Prostate* 2005;64:283-92.
- [74] Johnson M, Thiesen B, Wust P, Jordan A. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. *International Journal of Hyperthermia* 2005;21:637-47.

- [75] Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, *et al.* Intracranial Thermotherapy using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* 2007;81:53-60.
- [76] Jordan A, Scholz R, Wust P, Föhling H, Krause E-G, Wlodarczyk W, *et al.* Effects of Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *International Journal of Hyperthermia* 1997;13:587-605.
- [77] Sadhukha T, Niu L, Wiedmann T, Panyam J. Effective Elimination of Cancer Stem Cells by Magnetic Hyperthermia. *Molecular Pharmaceutics* 2013;10:1432-41.
- [78] Sadhukha T, Wiedmann T, Panyam J. Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy. *Biomaterials* 2013;34:5163-71.
- [79] Yanase M, Shinkai M, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Japanese Journal of Cancer Research* 1998;89:775-82.
- [80] Loh JW, Schneider J, Carter M, Saunders M, Lim L-Y. Spinning disc processing technology: Potential for large-scale manufacture of chitosan nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010;99:4326-36.
- [81] Alves AM. Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe₃O₄. Faculdade de Ciências e Tecnologia: Universidade Nova de Lisboa; 2012.
- [82] Mohammad K. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr Polym* 2007;68:477-88.
- [83] Talelli M, Rijcken C, Lammers T, Seevinck P, Storm G, Van Nostrum C, *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 2009;25:2060-7.
- [84] Biomagnetics n. The nex step on Magnetic Hyperthermia research.
- [85] Egerton R. The Scanning Electron Microscope. In: Inc. SSBM, editor. *Psysical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM and AEM* 2005. p. 125-53.
- [86] Jaiswal M, Banerjee R, Pradhan P, Bahadur D. Thermal behavior of magnetically modalized poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan based nanohydrogel. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2010;81:185-94.
- [87] Dumitriu R, Oprea A-M, Vasile C. A Drug Delivery Systhem Based on Stimuli-responsive alginate/n-isopropylacrylamide hydrogel. *Cellulose Chemistry and Thechnology* 2009;43:251-62.
- [88] Baran EJ. Spectroscopic investigation of the VO₂+/chitosan interaction. *Carboydrate Polymers* 2008;74:704-6.
- [89] Peniche-Covas C, Arguelles-Monal W, San Román J. A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability* 1993;39:21-8.
- [90] Zhang H-f, Zhong H, Zhang L-L, Chen S-b, Zhao Y-j, Zhu Y-I. Synthesis and characterization of thermosensitive graft copolymer of N-isopropylacrylamide with biodegradable carboxymethylchitosan. *Carbohydrate Polymers* 2009;77:785-90.
- [91] Lee C-F, Wen C-J, Chiu W-Y. Synthesis of Poly(chitosan-N-isopropylacrylamide) Complex Particles with the Method of Soapless Dispersion Polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 2003;41:2053-63.

[92] Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst Q. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2009;321:1509-13.

[93] Qu J, Liu G, Wang Y, Hong R. Preparation of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles used for hyperthermia. *Advanced Powder Technology*;21:461-7.